

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



**PAPEL DE LA PROTEÍNA DESACOPLANTE UCP2
EN EL ESTRÉS OXIDATIVO PROVOCADO POR
LA METFORMINA EN EL ADIPOCITO BLANCO.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Andrea Anedda

Bajo la dirección de la doctora

María del Mar González Barroso

Madrid, 2010

ISBN: 978-84-693-5977-8

© Andrea Anedda, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología molecular I



**PAPEL DE LA PROTEÍNA DESACOPLANTE
UCP2 EN EL ESTRÉS OXIDATIVO
PROVOCADO POR LA METFORMINA
EN EL ADIPOCITO BLANCO**

Andrea Anedda

Madrid, 2009



CONSEJO SUPERIOR
DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS



Memoria que presenta

Andrea Anedda

Para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas

María del Mar González-Barroso, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora “Ramón y Cajal” del Centro de Investigaciones Biológicas certifica que la presente Tesis Doctoral ha sido realizada bajo mi dirección por el Licenciado **Andrea Anedda** en el Departamento de Medicina Celular y Molecular del Centro de Investigaciones Biológicas del C.S.I.C. (Madrid).

Madrid, a 30 de Octubre del 2009

El Director de Tesis

El Doctorando

Dra. María del Mar González-Barroso

Andrea Anedda

*"UN GIORNO SENZA SORRISO
É UN GIORNO PERSO"
charlie chaplín*

*"UN DÍA SIN SONRISA
ES UN DÍA PERDIDO"
charlie chaplín*

AGRADECIMIENTOS

Dicen los sabios latinos que **“Faber est suae quisque fortune”** (cada uno se construye su propio destino)...y tenían razón. Miro estas hojas y todavía no me lo creo, quien me lo iba a decir el primer día que pisé tierra española que acabaría doctorándome en una de las más prestigiosas universidades del mundo. Si señores, la vida da muchas vueltas y yo me siento muy afortunado y muy orgulloso por haber llegado hasta este punto.

En estos años he recibido un apoyo especial de parte de mucha gente que ha permitido que este sueño se hiciera realidad. En primer lugar quisiera dar la gracia a mi directora de tesis, la Dra. Mar González-Barroso, porque me ayudó a recuperar el “rumbo científico” y sobretodo porque me enseñó que el compañerismo, la pasión por el trabajo y el respecto hacia los demás son valores imprescindibles para tener éxito en este mundo de la investigación. Mar es una gran persona y tiene toda mi admiración. También tengo que agradecerle al Dr. Eduardo Rial la oportunidad de trabajar en su laboratorio y de haber cuidado, junto a Mar, mi formación científica. Con el he aprendido que nunca hay que rendirse y que siempre podemos mejorar. Y que decir de mis compañeros del laboratorio, con ellos he compartido ideas, consejos, poyata, pipetas...pero nunca una discusión o una mala contestación. Gracias Pilar, Eva, Leo, Eunate, por haber transformado las situaciones cotidianas en agradables y porque trabajar en un grupo como este no tiene precio.

Entre la gente del CIB hay muchas personas que han estado siempre disponibles a echar una mano, a aconsejarme y a resolver cualquier duda científica y no científica. Por eso expreso mis agradecimientos a todos, en particular a “los vecinos”, un gran grupo que hace del esfuerzo y del sacrificio sus armas ganadoras; a la gente del “labo de Vicente”; a Blanca la responsable del servicio de cultivos celulares, porque sólo ella sabe cuanto hemos peleados en ese cuarto para que nuestros cultivos celulares fueran siempre en las mejores condiciones posibles; a Pedro el responsable del servicio de citometría de flujo, su preciosa colaboración me ha ayudado a afinar las condiciones de trabajo y a interpretar numerosos resultados intrincados. A todos mil veces gracias.

Y ahora...llega el momento más emotivo. Será siempre difícil expresar en palabras lo que siento para la gente de mi entorno personal, pero lo voy a intentar. Quiero dar la gracia a mi mujer Begoña para todo el entusiasmo y la energía que ha sabido transmitirme todos los días desde que la conozco y que ha contribuido a que mi espíritu en el trabajo fuera siempre positivo. Gracias por compartir conmigo las alegrías y los

momentos duros y estar siempre a mi lado en los momentos más importantes de mi vida. Y que decir de mi familia, tan lejos pero tan cerca, *Mamma e Papá* podéis sentirnos orgullosos de que el sacrificio, la comprensión, el eterno cariño y la educación que me habéis dado hoy tienen recompensa y hay que disfrutarla. No olvidaré nunca vuestra determinación en insistir en los estudios, cuando la vida se inclinaba por otro lado. ¡Y mi hermanita! Ha sido y es imprescindible para mí. Alessia eres una espléndida persona, alegre, divertida y una gran P.R. by night ;)).

Y *dulcis in fundo* quiero resaltar el gran papel que ha tenido la polifacética familia Espadas-Manzanas en estos años. Sois lo mejor que me hubiera podido pasar. La alegría, felicidad y jocosidad son vuestro estilo de vida. Transformáis cualquier situación en un momento de fiesta y de celebraciones, pero sobre todo me habéis enseñado que un día sin sonrisa es un día perdido.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	15
INTRODUCCIÓN	21
PARTE 1:	
BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL	23
1.1 LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA	23
1.2 LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO	24
1.2.1 Formación de las especies reactivas del oxígeno en la mitocondria	25
1.2.2 Aspectos fisiológicos de las especies reactivas del oxígeno	27
1.2.3 Sistema de defensa antioxidante	28
1.3 TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES	31
PARTE 2:	
LA FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS DESACOPLANTES UCPs	34
2.1 DESCRIPCIÓN DE LAS UCPS	34
2.2 FILOGENIA DE LAS UCPs	36
2.3 ESTRUCTURA GÉNICA EN MAMÍFERO	37
2.4 REGULACIÓN A NIVEL MOLECULARES DE LAS UCPs	39
2.4.1 Los nucleótidos de purina	40
2.4.2 Los ácidos grasos	41
2.4.3 Las especies reactivas del oxígeno	43
2.4.3.1 Regulación de la actividad de las UCPs por el superóxido	44
2.4.3.2 Regulación de la actividad de las UCPs por el 4-hidroxinonenal	44
PARTE 3:	
ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DE LAS UCPs	47
3.1 POSIBLE PAPEL DE LA UCP2 EN LA CÉLULA	47
3.1.1 Papel de la UCP2 en el estrés oxidativo	47
3.1.2 Papel de la UCP2 en la homeostasis del calcio	49
3.1.3 Papel de la UCP2 en el metabolismo de la glucosa	51
3.2 IMPLICACIÓN DE LA UCP2 EN LAS PRINCIPALES	
PATOLOGÍAS	52
3.2.1 UCP2 en las enfermedades neuronales	52
3.2.2 UCP2 en el cáncer	54
3.2.3 UCP2 en la diabetes	55
3.2.4 UCP2 en la obesidad	58
PARTE 4:	
UCP2 Y EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	60
4.1 EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	60
4.1.1 Aspectos metabólicos del tejido adiposo blanco	61
4.1.2 La proteína AMPK: regulador clave del balance energético	62

4.1.3 Función endocrina del tejido adiposo blanco: las adipoquinas	65
4.2 UCP2 EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO	69
4.3 LA METFORMINA	71
OBJETIVOS	77
MATERIALES Y MÉTODOS	81
PARTE 1:	
MATERIALES	83
1.1 MATERIAL BIOLÓGICO	83
1.1.1 Línea celular	83
1.1.2 Animales de experimentación	83
1.2 MATERIAL NO BIOLÓGICO	83
1.2.1 Agentes y tratamientos celulares	83
PARTE 2:	
MÉTODOS	85
2.1 TRATAMIENTO CON METFORMINA EN RATONES C57BL/6	85
2.2 CULTIVOS CELULARES	86
2.2.1 Condiciones de cultivos celulares	86
2.2.2 Técnicas de diferenciación celular	86
2.2.3 Tratamiento de los adipocitos con distintos agentes	87
2.2.4 Cuantificación de lípidos intracelulares por tinción con el colorante Oil-red-O	88
2.3 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS	88
2.3.1 Extracción de mitocondrias a partir de adipocitos en cultivo	88
2.3.2 Extracción de mitocondrias a partir de tejido blanco de ratón	89
2.3.3 Extracción celular total a partir de adipocitos en cultivo	89
2.3.4 Métodos de cuantificación de proteínas	89
2.3.5 Electroforesis de RNA. Técnica de Northern Blot	90
2.3.6 Western Blot e inmunodetección de la proteína UCP2	91
2.3.7 Western Blot e inmunodetección de las proteínas ACC y AMPK	92
2.4 MEDIDAS DE ESTRÉS OXIDATIVO	94
2.4.1 Detección de las especies reactivas del oxígeno por citometría de flujo	94
2.4.2 Actividad de la aconitasa en el gel de electroforesis	94
2.4.3 Actividad de la superóxido dismutasa	95
2.4.4 Cuantificación de glutatión total	96
2.4.5 Medidas de apoptosis celular por citometría de flujo	97
2.5 ANÁLISIS DEL METABOLISMO CELULAR	97
2.5.1 Medida de liberación de glicerol como índice de glicolisis	97

2.5.2 Actividad de la ácido graso sintasa	98
2.5.3 Medidas del ATP celular	99
2.6 ESTUDIOS DE PARÁMETROS ENERGÉTICOS	100
2.6.1 Medidas de consumo de oxígeno	100
2.6.2 Medidas de oxidación de los ácidos grasos	103
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	104
2.7.1 Método empleado	104
RESULTADOS EXPERIMENTALES	105
PARTE 1:	
CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR ADIPOCITARIA 3T3-L1	107
1.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE LA DIFERENCIACIÓN	107
1.2 NIVELES BASALES DE LA EXPRESIÓN DE UCP2 ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN	108
1.3 NIVELES BASALES DE UCP2 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN	109
PARTE 2:	
EFFECTOS DE LA METFORMINA EN EL ADIPOCITO BLANCO	109
2.1 LA METFORMINA INHIBE LA ADIPOGÉNESIS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN	109
2.2 LA METFORMINA INDUCE LA EXPRESIÓN DE UCP2 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN	111
2.3 LA INDUCCIÓN DE LA UCP2 SE DEBE A LA METFORMINA Y NO A LA INSULINA	111
2.4 LA METFORMINA INDUCE LA EXPRESIÓN DE UCP2 <i>IN VIVO</i>	112
2.5 LA METFORMINA CAUSA ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA DIFERENCIACIÓN	113
2.5.1 La metformina incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno	114
2.5.2 La metformina inhibe la actividad de la aconitasa	115
2.6 LA METFORMINA ESTIMULA LA LIPOLISIS SÓLO AL FINAL DE LA DIFERENCIACIÓN	117
PARTE 3:	
EFFECTOS DE LA METFORMINA EN EL ADIPOCITO MADURO	119
3.1 LA METFORMINA INDUCE LA EXPRESIÓN DE UCP2	119
3.2 EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO	120
3.2.1 La metformina incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno	121
3.2.2 La metformina tiene un efecto apoptotico	122

3.2.3 La metformina provoca un aumento de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa	125
3.2.4 La metformina aumenta la cantidad de glutatión oxidado	125
3.3 EFECTOS DE LA METFORMINA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO	126
3.3.1 La metformina inhibe la actividad de la enzima acetil CoA carboxilasa	127
3.3.2 La metformina inhibe la actividad de la enzima ácido graso sintasa	127
3.3.3 La metformina no promueve una mayor oxidación de los ácidos grasos	128
3.3.4 La metformina no estimula la lipólisis	131
3.4 EFECTOS DE LA METFORMINA SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO	131
3.4.1 La metformina promueve la activación de la proteína AMPK	132
3.4.2 La metformina provoca una disminución del ATP celular	132
PARTE 4:	
PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA METFORMINA	134
4.1 IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA ACTIVACIÓN DE LA AMPK Y EN LA INDUCCIÓN DE LA UCP2	134
4.1.1 El tiron reduce el efecto de la metformina sobre la generación de especies reactivas del oxígeno	134
4.1.2 El tiron inhibe la inducción de la UCP2 promovida por la metformina	135
4.1.3 El tiron no influye sobre la activación de la AMPK	136
PARTE 5:	
ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA METFORMINA	137
5.1 EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL	137
5.1.1 Comparación del efecto inhibitorio de la metformina y de la rotenona sobre la respiración mitocondrial	141
5.1.2 Comparación del efecto del FCCP sobre la capacidad máxima respiratoria de la metformina y de la rotenona	142
DISCUSIÓN	145
PARTE 1:	
EL PAPEL DE LA UCP2 EN EL ADIPOCITO BLANCO	147
1.1 INDUCCIÓN DE LA UCP2 POR METFORMINA	147

1.2 INDUCCIÓN DE LA UCP2 EN EL ESTRÉS OXIDATIVO	149
1.3 CORRELACIÓN ENTRE LA UCP2 Y LA AMPK	151
1.4 PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN EL EFECTO DE LA METFORMINA	153
1.5 EFECTO DE LA AMPK EN EL METABOLISMO LIPÍDICO DEL ADIPOCITO BLANCO	157
1.6 PAPEL DE LA UCP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO	158
1.7 HACIA LA COMPRESIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA METFORMINA	160
CONCLUSIONES	165
BIBLIOGRAFÍA	169

ABREVIATURAS

$\Delta\mu_{H^+}$	Gradiente de potencial electroquímico de protones
$\Delta\psi$	Diferencia de potencial eléctrico
ΔPh	Diferencia de potencial químico
ACC	Acetil CoA carboxilasa
ADP	Adenosin difosfato
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside
AMP	Adenosin monofosfato
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
AMPK	Quinasa dependiente de AMP
ANT	Translocasa de adenin nucleótidos
ATGL	Lipasa de triglicéridos
ATP	Adenosin trifosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CAMKK β	Quinasa β dependiente de calmodulina
CAT	Carboxiatractilato
CoQ	CoenzimaQ
CPT	Carnitina palmitoil transferasa
DHE	Dihidroetidina
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
EDTA	Ácido etilen diaminotetraacetico
FAS	Ácido graso sintasa
FCCP	Carbonilcianida-p-trifluorometoxifenilhidrazona
FMN	Flavin mononucleótido
FADH ₂	Flavina adenina dinucleótido
GDH	Glicerofosfato dehidrogenasa
GDP	Guanosin difosfato
GK	Gliceroquinasa
GSH	γ -glutamilcisteinilglicina (glutación)
GSSG	Glutación oxidado
GLU 134	Glutamico 134
GLUT	Receptor de glucosa
GSH	Glutación reducido
GTP	Guanosin trifosfato
4-HNE	4-Hidroxi-2-nonenal
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HMGCoA	3-hidroxi-3-metilglutatil CoA
HSL	Lipasa sensible a hormonas
IBMX	Isobutilmetil xantina

IDP	Inosin difosfato
IGF-1	Factor de crecimiento de la insulina
IL	Interleuquina
IRS	Substrato del receptor de insulina
ITP	Inosin trifosfato
LKB1	Proteínquinasa B supresora de tumor
LPL	Lipoproteína lipasa
MDA	Malondialdehído
MTT	3-(4,5 Dimetiazol-2-il)-2-5 difeniltetrazol
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NO²⁻	Dióxido de nitrógeno
NBT	Azul de tatrazolum nitrato
O²⁻	Anión superóxido
OH⁻	Radical hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
PBS	Solución salina de fosfato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxiquinasa
PGC-1α	Coactivador transcripcional 1 α de PPAR γ
PPAR	Receptores activados por la proliferación de los peroxisomas
PTPm	Poro de transición en la permeabilidad mitocondrial
RNS	Especies reactivas del nitrógeno
ROO⁻	Radical peróxido
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SCaMC	Transportador mitocondrial sensible al calcio
SEM	Error estándar de la media
SOD	Superóxido dismutasa
TAB	Tejido adiposo blanco
TAP	Tejido adiposo marrón o pardo
TBS	Solución salina de tris
TDZ	Tiazolinediona
TNF-α	Factor de necrosis nuclear α
UCP	Proteína desacoplante

INTRODUCCIÓN

PARTE 1

BIOENERGÉTICA MITOCONDRIAL

1.1 LA FOSFORILACIÓN OXIDATIVA

En el año 1961 Peter Mitchell propuso la teoría quimio-osmótica para explicar el acoplamiento entre la oxidación de los sustratos y la producción de ATP en la fosforilación oxidativa. En esta teoría se postuló que la cadena transportadora de electrones mitocondrial está acoplada a la síntesis de ATP mediante un gradiente de potencial electroquímico de protones ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) que se crea a través de las membranas transductoras de energía (Mitchell 1961; Mitchell 1976).

Durante la respiración mitocondrial, la oxidación de los sustratos genera un flujo de electrones que se transfiere de un complejo a otro de la cadena respiratoria mitocondrial. Este flujo genera energía, que es utilizada para expulsar protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana. De este modo, debido a que la membrana interna mitocondrial es impermeable a protones, se genera un $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$, que consta de dos componentes: la diferencia de potencial eléctrico ($\Delta\psi$) y la diferencia de concentración (ΔpH). La energía de este gradiente se utilizará para producir ATP en la ATPasa mitocondrial o para el transporte de iones y metabolitos a través de la membrana interna mitocondrial. En estado estacionario el bombeo de protones tiene que estar compensado con la reentrada de estos en la matriz. Como la principal vía de reentrada de los protones es la ATPasa, se puede decir que el flujo de protones se encuentra acoplado a la síntesis de ATP, y por tanto, la velocidad de respiración depende fundamentalmente de la demanda de ATP en la célula.

La eficiencia de la fosforilación oxidativa puede reducirse en determinadas situaciones, donde interesa estimular la respiración sin que haya síntesis de ATP. Por ejemplo en plantas, las oxidasas alternativas constituyen una ruta diferente para los electrones que fluyen a través de la cadena respiratoria (Borecky and Vercesi 2005). En este caso los electrones que fluyen hacia el complejo III pasan directamente a la oxidasa alternativa que cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua. Este proceso se considera una estrategia para hacer frente a variaciones ambientales, estrés oxidativo o infección de patógenos.

Además, existen también vías alternativas a la ATPasa que permiten la reentrada de los H^+ en la matriz disminuyendo el $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. Este regreso puede ser catalizado por las proteínas desacoplates UCPs (aunque esta función es bien establecida solamente para la UCP1) o puede ser favorecido de un aumento de la permeabilidad de la membrana

interna. En este sentido se ha descrito que la hormona tiroidea T3 induce cambios en la composición fosfolipídica de la membrana interna mitocondrial, provocando el aumento de la permeabilidad a protones (Wrutniak-Cabello, Casas et al. 2001).

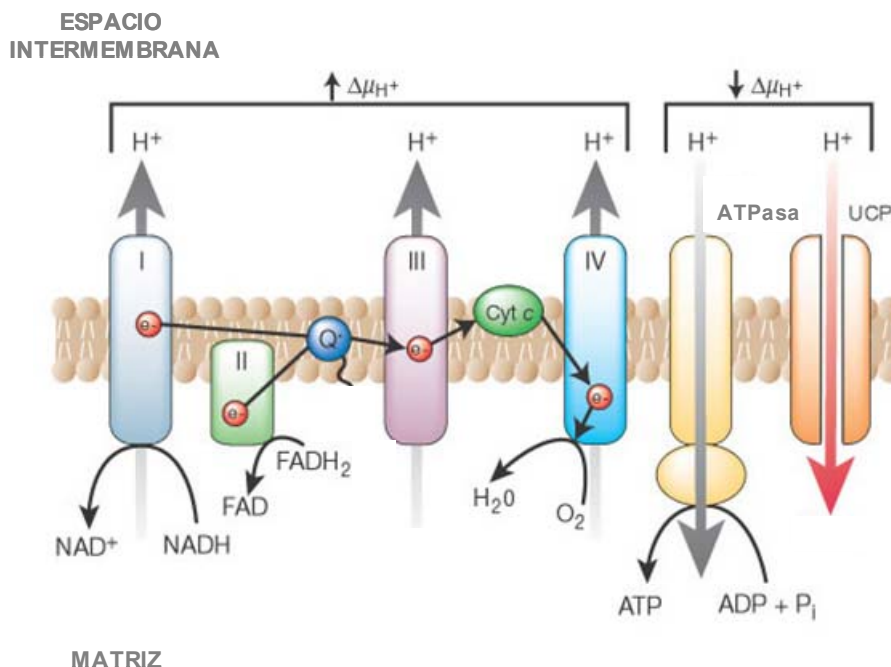


Fig. II. Esquema de la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa. En la cadena transportadora de electrones mitocondrial el Complejo I recibe los electrones del $NADH$, mientras que el complejo II los recibe del succinato. Estos electrones se transfieren de ambos complejos a la CoQ que los cede al complejo III. Desde este complejo los electrones son cedidos al citocromo c y al complejo IV, que a su vez cataliza la reducción del oxígeno molecular a agua. Las UCPs constituyen una vía alternativa de reentrada de protones en la matriz, permitiendo el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Imagen extraída de Brownlee, [2001].

1.2 LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO

Las especies reactivas del oxígeno (ROS) son mayoritariamente un subproducto de la fosforilación oxidativa. Como se observa en la figura I2, a partir del oxígeno molecular se producen una serie de intermediarios reactivos hasta su completa reducción a H_2O . Entre ellos los más destacables son el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Pese a que el $O_2^{\cdot-}$ y el H_2O_2 son moléculas poco reactivas, son las precursoras del OH^{\cdot} que es una molécula con una alta capacidad oxidativa.

Cabe señalar la existencia de otra familia de moléculas reactivas derivadas del óxido nítrico (NO) que se conocen como especies reactivas del nitrógeno (RNS). El óxido nítrico puede reaccionar con el anión superóxido y generar especies extremadamente reactivas, entre las cuales se señala el peroxinitrito ($ONOO^-$).

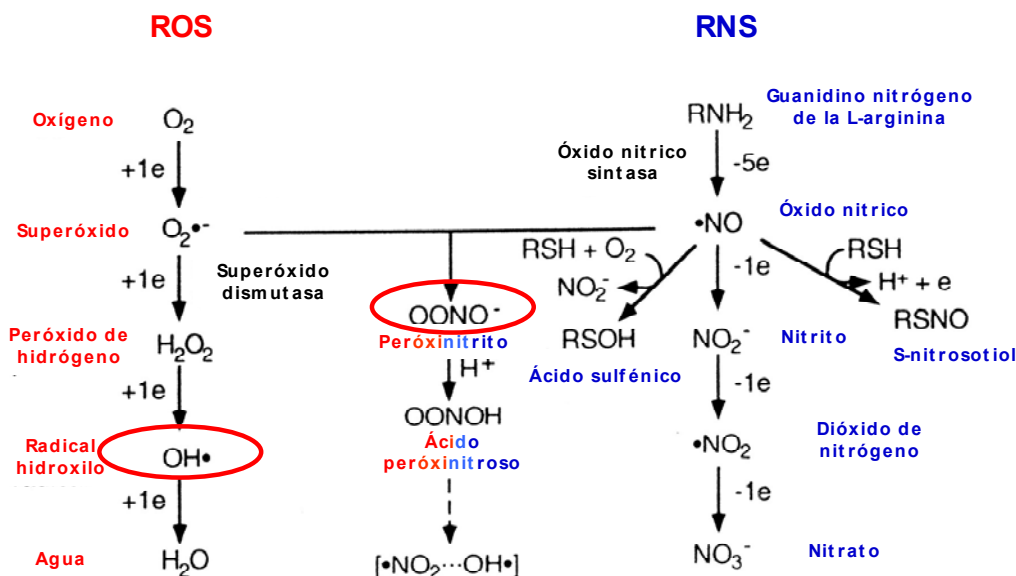


Fig. I2 Formación de las especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS). La formación de las ROS se debe a la reducción univalente del oxígeno, mientras que la formación de las RNS se debe a la oxidación univalente del óxido nítrico. El superóxido y el óxido nítrico pueden reaccionar entre sí y dar lugar a especies altamente reactivas. Con el círculo rojo están marcadas las moléculas con más capacidad oxidativa.

1.2.1 Formación de las especies reactivas del oxígeno en la mitocondria

En la fosforilación oxidativa el oxígeno molecular actúa como aceptor final de electrones en el complejo IV para formar agua. Sin embargo, en condiciones fisiológicas, se puede producir una reducción incompleta del oxígeno para formar el anión superóxido. La reducción incompleta del oxígeno tiene lugar principalmente en el complejo I y en el complejo III, que se consideran los máximos productores de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la mitocondria (Turrens 2003; AdamVizi and Chinopoulos 2006; Murphy 2009). Durante la respiración mitocondrial alrededor del 1% del oxígeno es convertido en anión superóxido. Boveris y Cadenas demostraron que el $O_2^{\cdot-}$ es el precursor estequiométrico del H_2O_2 (Boveris and Cadenas 1975). Esto indica que la producción de H_2O_2 en las mitocondrias es el resultado de la reducción univalente del oxígeno por algunos de los transportadores de electrones de la cadena respiratoria.

La formación del superóxido depende de la velocidad del flujo de los electrones a través de los centros catalíticos del complejo I y III. Si el flujo es lento ($\Delta\psi$ elevado), los centros redox se encuentran en estado reducido, por lo que el oxígeno tiene más posibilidad de captar un electrón y formarse el anión superóxido. En el complejo III se sabe que la CoQ juega un papel clave en la generación del anión superóxido, sufriendo una oxidación y una reducción durante un ciclo llamado “ciclo de las quinonas o Q protonmotriz”. Durante este ciclo se asiste a la generación de la ubisemiquinona

(CoQH⁻), un radical libre intermedio altamente reactivo (Raha and Robinson 2000). En este caso la formación del anión superóxido es favorecida del tiempo en el que permanece el CoQ en este estado de ubisemiquinona (situación en la que la respiración mitocondrial es lenta y el $\Delta\psi$ elevado). La formación de O₂⁻ se puede generar también por el flujo reverso de los electrones desde el complejo II hacia el complejo I, cuando el sustrato oxidado es el succinato. Para que esto ocurra es necesario un elevado potencial de membrana.

Distintos agentes citotóxicos que inhiben la actividad del complejo I y del complejo III favorecen la formación de ROS (Genova, Pich et al. 2003; Fato, Bergamini et al. 2008). Entre estos agentes cabe destacar la rotenona (un inhibidor del complejo I) y la antimicina A (un inhibidor del complejo III). A pesar de que el centro de unión de la rotenona no ha sido aún localizado, se conoce que en presencia de este inhibidor los centros redox se encuentran en forma reducida (Votyakova and Reynolds 2001), por lo que se produce una elevada cantidad de O₂⁻. Por otro lado, la antimicina A favorece la formación del radical ubisemiquinona, permitiendo que el oxígeno reaccione con este radical y se genere el anión superóxido (Turrens, Alexandre et al. 1985).

En resumen, se puede decir que la generación de superóxido por los complejos I y III de la cadena transportadora mitocondrial depende del estado de los centros redox. Cuando en presencia de sustrato oxidable se produce una disminución del flujo electrónico a través de la cadena respiratoria, estos centros están en forma reducida, aumenta el $\Delta\psi$, lo que favorece la reducción incompleta del oxígeno. Así, aquellos factores que aceleran la respiración y bajan el $\Delta\psi$, tienen la capacidad de disminuir la producción mitocondrial de ROS.

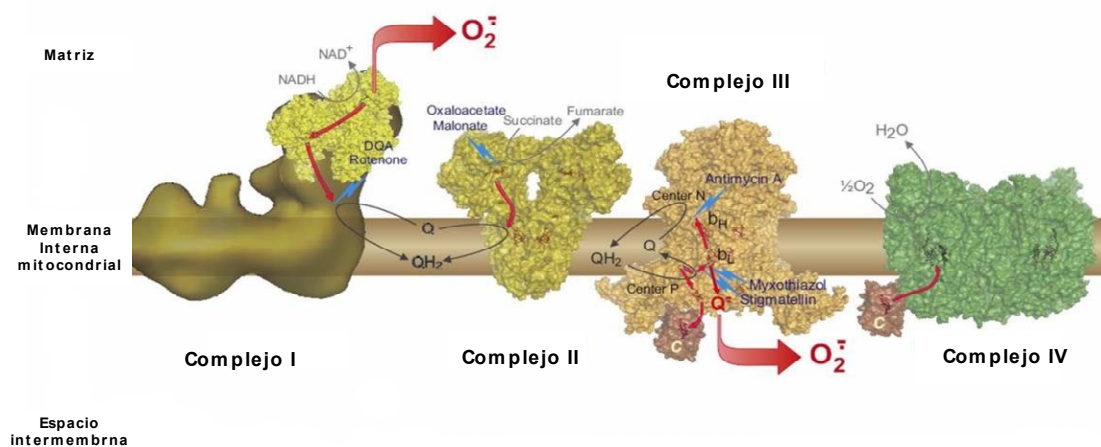


Fig. 13. Formación de ROS en los complejos I y III de la cadena respiratoria mitocondrial. Este proceso es provocado por un elevado potencial que lleva a la inhibición del transporte de los electrones por la cadena respiratoria. Imagen extraída de Brandt, [2008].

1.2.2 Aspectos fisiopatológicos de las especies reactivas del oxígeno

Existen numerosos procesos fisiológicos que son regulados por las ROS. Desempeñan un importante papel en proliferación, adhesión y supervivencia celular; procesos inflamatorios y respuesta inmune; control de la actividad transcripcional (Fleury, Mignotte et al. 2002; Valko, Leibfritz et al. 2007; Trachootham, Lu et al. 2008). En condiciones fisiológicas la célula mantiene un balance redox y cualquier variación de este equilibrio se traduce en la activación de vías de señalización intracelulares. El aumento de ROS comporta la activación del sistema antioxidante para reequilibrar la homeostasis óxido-reducción. Esta beneficiosa respuesta al aumento de ROS es una característica presente en los seres vivos, incluso bacterias, que tienen la capacidad de incrementar sus niveles de glutatión o la expresión de proteínas antioxidantes en respuesta al aumento de los niveles de ROS. Bajo ciertas condiciones, donde los niveles altos de ROS persisten, el sistema antioxidante no es capaz de restablecer los niveles originales. En estos casos el sistema puede alcanzar otro equilibrio donde la expresión de ciertas proteínas sensibles al cambio redox varía estableciendo este nuevo estado estacionario. Estas nuevas condiciones de equilibrio evitan que los niveles de ROS desemboquen en procesos patológicos (Droge 2002).

Cuando la concentración intracelular de las ROS es excesiva y supera el umbral fisiológico, se origina un desequilibrio del balance redox conocido como estrés oxidativo. Este estado, debido a la alta reactividad de las ROS, puede provocar daños por oxidación de lípidos, proteínas y nucleótidos (Ott, Gogvadze et al. 2007), lo cual produce acumulación de agregados intracelulares, disfunción mitocondrial y apoptosis. El daño oxidativo ha adquirido en los últimos años un gran protagonismo en el campo de la patología porque se ha podido confirmar que el estrés oxidativo está implicado en desarrollo de las principales patologías humanas como enfermedades cardiovasculares, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes *mellitus*, obesidad, envejecimiento y otras más (Dalle-Donne, Rossi et al. 2006).

Los lípidos son oxidados en un proceso que se conoce como peroxidación lipídica, que afecta principalmente a las estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturados. Este proceso lleva a la degradación de los lípidos que dan origen a una amplia variedad de compuestos citotóxicos, como los aldehídos 4-hidroxi 2-nonenal (4-HNE) y malondialdehído (MDA). En la mitocondria este proceso puede llevar a la apertura del poro de transición en la permeabilidad mitocondrial (PTPm, *mitochondrial permeability transition pore*) y, por tanto, a la inducción de la apoptosis.

El ADN es muy sensible al daño oxidativo, sobretodo en fase de replicación, ya que en ese momento el ADN esta menos compactados y no está protegido por histonas. Las ROS provocan la fragmentación del ADN, ocasionando problemas en su compactación y enrollamiento dentro de la cromatina. El ADN mitocondrial es particularmente susceptible al daño oxidativo debido a que, por su localización, se encuentra expuesto a un flujo constante de ROS proveniente de la cadena respiratoria.

Las proteínas también constituyen un blanco para las ROS. Pueden sufrir modificaciones irreversibles por oxidación como la formación de di-tirosinas, *cross-linking* entre proteínas, carbonilación de los residuos arginina y lisina, etc. En estos casos, las proteínas oxidadas son reconocidas por las proteasas y finalmente degradadas. Cabe destacar la importancia de la oxidación de los grupos sulfidrilos, puesto que estos grupos son claves para la estructura de la proteína. La oxidación de las cisteínas puede ser revertido por la acción del glutatión antes de que esta oxidación provoque un daño irreversible.

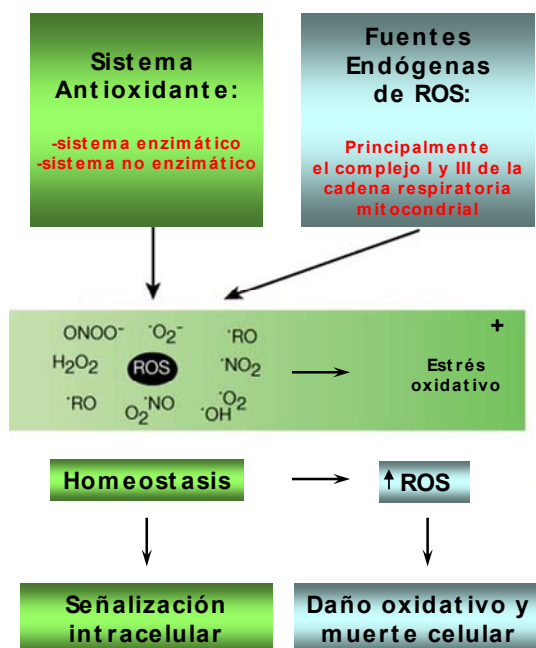


Fig. I4. Esquema del balance redox. El equilibrio redox es el resultado de la formación y eliminación de ROS en la célula. Cuando la homeostasis de oxido reducción es alterada por una excesiva producción de ROS, la célula entra en un estado de estrés oxidativo que puede provocar importantes daños oxidativos y apoptosis.

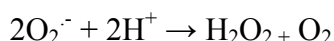
1.2.3 Sistema de defensa antioxidante

El organismo posee un eficiente sistema de destoxificación y de defensa antioxidante para protegerse del daño oxidativo. Los mecanismos antioxidantes dependen del tipo de especie reactiva y del lugar donde ésta se genera. El sistema antioxidante se divide en

enzimático o primario y no enzimático o secundario (Nordberg and Arner 2001; Valko, Leibfritz et al. 2007).

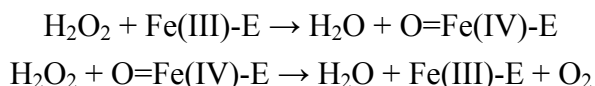
A) El primario está formado por distintos enzimas que trabajan en cadena para neutralizar selectivamente los radicales libres. Las enzimas principales del sistema antioxidante primario son:

Superoxido dismutasa (SOD): Fue la primera enzima antioxidante que se descubrió (McCord and Fridovich 1969). Su función es catalizar la dismutación del superoxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno según la reacción:



En humanos se clasifican 3 diferentes grupos, de acuerdo al metal que contiene su estructura: la Mn-SOD mitocondrial, la Cu/Zn-SOD citosólica y la Cu/Zn-SOD extracelular (EC-SOD). A pesar de que el contenido celular de la Mn-SOD es la mitad de la Cu/Zn-SOD, la SOD mitocondrial es la única esencial para la supervivencia (Li, Huang et al. 1995).

Catalasa: Se considera una de las enzimas más eficientes presente en el organismo. Se localiza en los peroxisomas y cataliza la descomposición del H_2O_2 en oxígeno y agua, evitando así que se forme el radical hidroxilo (Halliwell 1999):



Donde Fe-E representa el núcleo de hierro del grupo hemo unido a la enzima que actúan como cofactores.

Glutación peroxidasa (GPx): Esta enzima selenio dependiente desempeña un importante papel catalizando la reducción de diferentes hidroperóxidos (ROOH y H_2O_2) utilizando como sustrato reductor el glutatión reducido (GSH), que es transformado en glutatión oxidado (GSSG) (Ursini, Maiorino et al. 1995).



A pesar de que la catalasa y la glutación peroxidasa comparten sustrato (H_2O_2), la GPx tiene más afinidad por el peróxido de hidrógeno, lo que le confiere un papel detoxificador más activo a bajas concentraciones de ROS, mientras que la catalasa interviene en condiciones de estrés oxidativo severo.

Glutación reductasa (GR): Esta enzima tiene un papel importantísimo en el metabolismo del GSH, puesto que se encarga de reducir el glutatión oxidado (GSSG) utilizando el NADH como cofactor de la reacción. De este modo el glutatión reducido puede ser regenerado.

Glutaredoxina (Grx) / Glutarredoxina reductasa (GrxR): La glutaredoxina son tiol oxidoreductasas que regulan el estado redox de los grupos sulfidrilo de las proteínas (Holmgren 2000). Puede ser reducida por las GrxR que utilizan el NADH como factor reductor.

Tiorredoxina (Trx) / Tiorredoxina reductasa (TrxR): El sistema “tiorredoxinas” consta de dos enzimas: Trx (oxidoreductasa) y TrxR (reductasa). Las Trx facilitan la reducción de otras proteínas a través de un intercambio ditiol-disulfuro.

La TrxR se encarga de mantener en estado reducido las Trx. Reduce su centro activo sirviéndose de NADPH como agente reductor (Holmgren and Bjornstedt 1995). La presencia de residuos selenocisteína (Sec) en el C-terminal le confiere la especificidad de reducir la tiorredoxina y la diferencia de otras reductasa como la glutatión reductasa.

UCPs: Estas proteínas se han relacionado con numerosos procesos patológicos mediados por el estrés oxidativos. Puesto que su actividad desacoplante debería prevenir la formación de ROS, se pueden considerar como parte del sistema antioxidante

B) El secundario está formado por distintos compuestos antioxidantes, endógenos y exógenos, que atrapan o neutralizan radicales libres. Entre los de origen exógeno se destaca la vitamina C, vitamina E, vitamina A; mientras entre aquellos de origen endógeno se destaca el glutatión.

Glutatión: Tiene una gran importancia en el mantenimiento del balance y regulación del estado tiol-redox (van Bladeren 2000). El glutatión existe en estado reducido (GSH) y oxidado (GSSG). En estado reducido, el grupo tiol de la cisteína es capaz de donar un electrón a otras moléculas inestables, como los hidropéroxidos, evitando así que se oxide y se forme el radical peróxido (ROO^\cdot). En la donación de este electrón, el glutatión mismo llega a ser reactivo, pero reacciona fácilmente con otro glutatión reactivo para formar disulfuro de glutatión (GSSG). Esta reacción es posible gracias a la elevada concentración de glutatión en el organismo. En las células y tejidos sanos, más del 90% del glutatión total está en la forma reducida (GSH) y menos del 10% en forma de disulfuro (GSSG). Dado que el sistema del glutatión es uno de los principales

mecanismos antioxidantes, el aumento de la proporción GSSG/GSH se considera una importante señal de estrés oxidativo.

Vitamina C (Ácido ascórbico): Esta molécula hidrofílica se considera el mayor antioxidante presente en el plasma e incluso en la membrana plasmática (Frei, Stocker et al. 1990). Su principal función es la de prevenir la peroxidación lipídica en las lipoproteínas del plasma y en las proteínas de las membranas plasmáticas reduciendo el radical α -tocoferol. Este radical se forma como subproducto de la reacción entre la vitamina E (llamada también α -tocoferol) y el radical peroxilo (ROO^\cdot).

1.3 LOS TRANSPORTADORES MITOCONDRIALES

Además de la síntesis de ATP, la mitocondria participa activamente en el metabolismo intermediario, que implica un continuo intercambio de metabolitos entre el citosol y la matriz mitocondrial. Puesto que la membrana interna mitocondrial es impermeable a la mayoría de estos metabolitos, la familia de transportadores de la membrana interna mitocondrial se encarga de facilitar este intercambio (Palmieri, Pardo et al. 2001; Palmieri 2004).

Entre las proteínas transportadoras más significativas se encuentran la translocasa de adenin nucleótidos (ANT), que se encarga de transportar a la matriz mitocondrial el ADP citosólico y, paralelamente transloca hacia el citosol el ATP recién sintetizado durante la fosforilación oxidativa; las UCPs que se postula que su función es, *a priori*, regular la eficiencia de la fosforilación oxidativa (esta función está bien establecida solamente para la UCP1); el transportador de fosfato (PiC), que importa fosfato citosólico a la matriz para fosforilar el ADP durante la fosforilación oxidativa. Cabe resaltar también el transportador de piruvato (PYC), el transportador de oxoglutarato (OGC) y el transportador de glutamato/aspartato (AGC).

La característica más destacable de la familia de transportadores es que tienen una estructura tripartita. Es decir, se caracterizan por poseer 3 dominios con una alta homología entre ellos, cada uno de 100 aminoácidos. Cada dominio contiene dos regiones hidrofóbicas transmembranales unidas por una larga región hidrofílica que se encuentran en el lado de la matriz (*loop* matricial). Otra pequeña región hidrofílica, que se encuentra en el espacio intermembrana, une los dominios entre sí (Kunji 2004). El análisis de la secuencia de estos transportadores ha señalado que existen dominios altamente conservados que se consideran las huellas dactilares de los miembros de esta familia y se utilizan para identificar nuevos transportadores mitocondriales. Estos residuos comunes son contiguos al sitio de unión del metabolito, específico por cada

transportador. Se ha descrito que el primero, PX[DE]XX[RK] se encuentra en el extremo C-terminal de la primera hélice de cada repetición y forma un puente salino cuando el sitio de unión al sustrato está abierto hacia el espacio intermembrana. El segundo motivo [FY][DE]XX[RK], presente en el extremo C-terminal del *loop*, forma un puente salino cuando el sitio de unión del sustrato está abierto hacia la matriz. Kunji y su grupo han propuesto que estos 2 puentes salinos son esenciales para el transporte del metabolito y que la apertura y cierre para el transporte depende de la formación y destrucción de estos puentes a través de una triple rotación provocada por la interacción del metabolito con su sitio de unión (Robinson, Overy et al. 2008).

Cabe destacar la existencia de una subfamilia llamada SCaMCs (del inglés *small calcium-binding mitochondrial carriers*), cuya función transportadora es regulada por el calcio citosólico. Su peculiaridad, con respecto a los otros transportadores, es que posee un dominio N-terminal específico de esta subfamilia, que alberga 4 motivos de unión al calcio “manos-EF” (del Arco and Satrustegui 2004).

La gran homología existente entre todos los dominios y a su vez entre todos los transportadores sugiere que la familia de transportadores mitocondriales se originó tras la triplicación de una secuencia ancestral común y a partir de la cual se diferenciaron los distintos transportadores (Walker and Runswick 1993). En el año 2003 se publicó la resolución de la estructura tridimensional de la ANT que confirmó las predicciones topológicas que se habían postulado anteriormente en función de los análisis de secuencia (Pebay-Peyroula, Dahout-Gonzalez et al. 2003). Se trata de una estructura en forma de barril abierto por el lado citosólico y con los *loops* matriciales cerrando la cavidad por el lado de la matriz (Fig. I5).

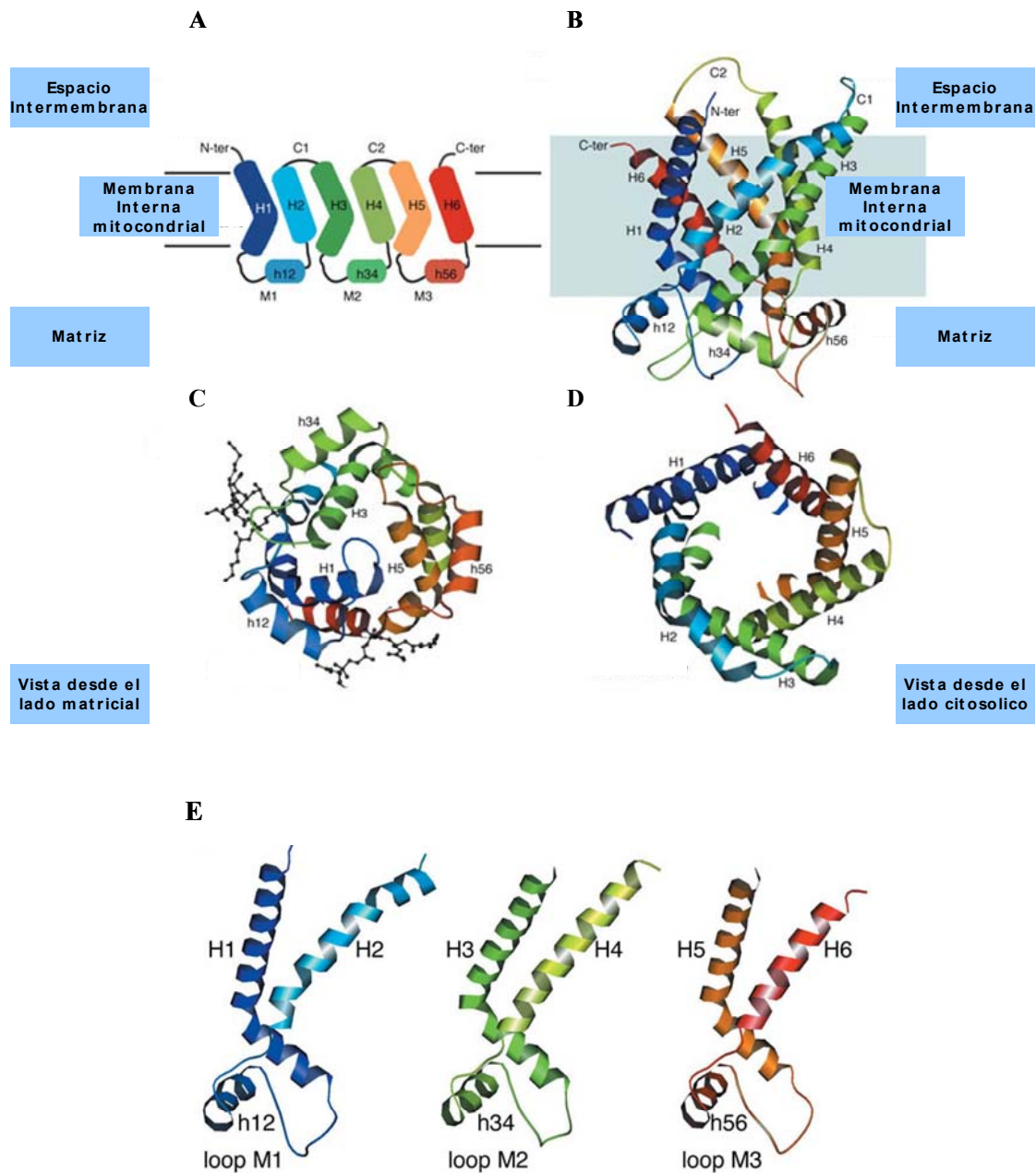


Fig. 15. Estructura tridimensional de la ANT de bovino. La estructura está coloreada de acuerdo a la secuencia, de azul (N-terminal) a roja (C-terminal). (A) Modelo estructural donde se aprecia que cada dominio consta de dos dominios transmembrana (H1 y H2, H3 y H4, H5 y H6) unidos por una región hidrofílica o "loop" presente en la matriz mitocondrial (M1, M2 y M3). En el espacio intermembrana se encuentran otras dos regiones hidrofílicas que conectan los tres dominios (C1 y C2). Tanto el extremo N-terminal como el C-terminal se encuentran en el espacio intermembrana. (B) Vista lateral de la estructura. (C) Vista desde el lado matricial, donde los loops cierran la cavidad. (D) Vista desde el lado citosólico, revelando la apertura de la cavidad hacia el lado matricial. (E) Orientación tridimensional de las tres repeticiones donde resalta su similitud. Imagen extraída de Pebay-Peyroula et al., [2003].

PARTE 2

LA FAMILIA DE LAS PROTEÍNAS DESACOPLANTES UCPs

2.1 DESCRIPCIÓN DE LAS UCPs

Como se ha descrito en el apartado anterior, las UCPs pertenecen a la familia de los transportadores mitocondriales de la membrana interna. La UCP1 fue la primera proteína desacoplante que se identificó hace más de treinta años (Ricquier and Kader 1976; Heaton, Wagenvoort et al. 1978) y se expresa exclusivamente en el tejido adiposo pardo (TAP). Su función es de permitir el paso de protones desde el espacio intermembrana hacia la matriz, provocando la disipación del gradiente de potencial electroquímico de protones en forma de calor durante la termogénesis sin tiritación o adaptativa (Nicholls and Rial 1999). El inicio de la termogénesis, a nivel celular, está controlado por el sistema nervioso simpático. La noradrenalina, liberada por las numerosas fibras simpáticas que inervan el tejido adiposo pardo, se une a los receptores β 3-adrenérgicos presentes en la membrana celular, activando la adenilato ciclasa. De esta forma se incrementan los niveles de AMPc provocando que una proteína quinasa active una lipasa sensible a hormonas (HSL). Los ácidos grasos liberados van a jugar un doble papel. Por un lado actúan sobre la UCP1 activando el transporte de protones mediado por ella y originando la producción de calor. Por otro lado, los ácidos grasos son convertidos a acil-CoA, que se convierte a acil-carnitina, la cual es transportada al interior de la matriz mitocondrial donde es oxidada. Los ácidos grasos ejercen, por tanto, el papel de segundos mensajeros de la noradrenalina (Nicholls and Locke 1984; Rial and Gonzalez-Barroso 2001)

Este proceso termogénico es clave en las primeras etapas de vida, ya que ayuda a compensar la pérdida de calor al abandonar el ambiente cálido y térmicamente estable del útero materno. Sin embargo, después de las primeras fases de vida, el TAP involuciona hasta perder su funcionalidad. En algunos mamíferos como los roedores esta regresión es solo parcial y el tejido puede aumentar su tamaño (hiperplasia) en respuesta a la exposición a bajas temperaturas o a una dieta hipercalórica (Cannon and Nedergaard 2004).

En el 1997 se identificó una proteína que compartía un 59% de identidad con la UCP1 y por eso se denominó UCP2 (Fleury, Neverova et al. 1997). Su distribución anatómica es muy amplia, habiéndose encontrado en múltiples tejidos y órganos (tejido adiposo blanco, bazo, pulmón, corazón, hígado, intestino, testículo, cerebro, útero, células beta-pancreáticas etc.). Su papel parece estar vinculado al control de las ROS, aunque se han

postulado otras funciones biológicas que serán discutidas más detalladamente en la parte 3 de la Introducción.

El mismo año en que se identificó UCP2, se publicó el descubrimiento de otra proteína con una homología del 54% a UCP1 y 73% a UCP2 y se llamó UCP3 (Boss, Samec et al. 1997; Vidal-Puig, Solanes et al. 1997). Se encuentra exclusivamente en la musculatura esquelética, corazón y tejido adiposo pardo donde su función parece ligada al metabolismo de los lípidos o al control de las ROS (Schrauwen and Hesselink 2002).

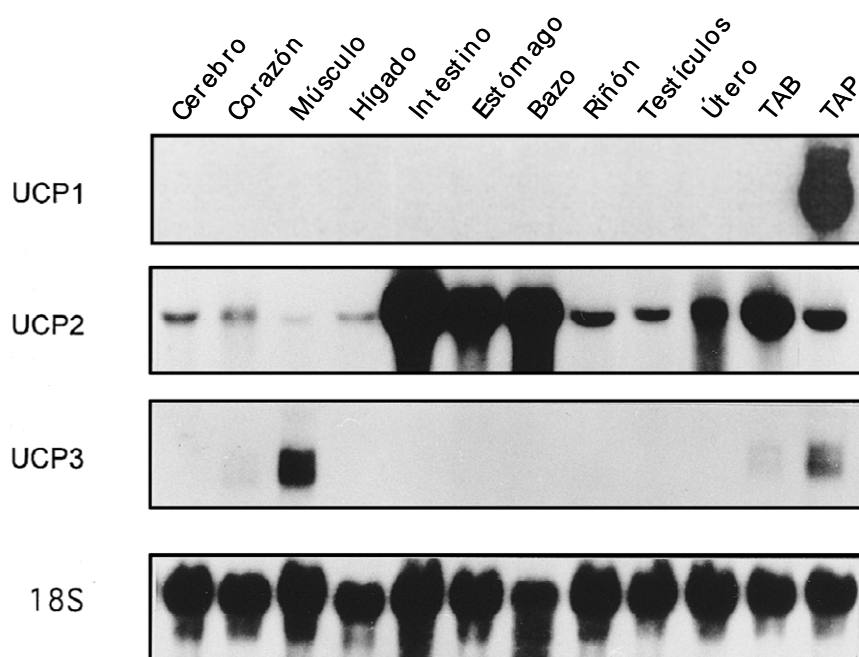


Fig. 16. Patrón de expresión de la UCP1, UCP2 y UCP3. De la distribución anatómica de estas proteínas destaca la expresión prácticamente ubicua de la UCP2. Imagen extraída de Ricquier y Bouillaud [2000].

Otras dos proteínas, UCP4 y UCP5 (o BMCP1, del inglés *brain mitochondrial carrier protein 1*), fueron descritas poco después con una homología de 29% y 34% con la UCP1 respectivamente. Se encuentran principalmente en cerebro y actualmente no existen datos concluyentes sobre su función, aunque algunos autores han propuesto que estén involucradas en la respuesta a estrés oxidativo (Kim-Han and Dugan 2005).

Durante estos últimos años se ha puesto de manifiesto que los genes que codifican proteínas desacoplates tienen una distribución muy amplia, habiéndose encontrado no sólo en animales sino también en plantas e incluso en organismos unicelulares (Ledesma, de Lacoba et al. 2002).

2.2 FILOGENIA DE LAS UCPs

Los estudios filogenéticos más recientes han ayudado en comprender la línea evolutiva que han seguido las proteínas desacoplantes (Rial and Zardoya 2009). En primer lugar, como se comentó anteriormente, todos los transportadores mitocondriales han evolucionado de una triplicación de una proteína primordial que contenía dos dominios transmembranales. Las UCP1, UCP2, UCP3 y las UCPs de plantas comparten un ancestro común que no incluía la UCP4 y UCP5, que, por lo tanto, se les considera evolutivamente más distantes e incluso se ha propuesto que estas dos proteínas no deberían considerarse proteínas desacoplantes. El gen ancestro de UCP1 se duplicó, originando el ancestro de UCP2 y UCP3, el cual, a su vez, volvió a duplicarse en UCP2 y UCP3. Estos tres genes parálogos se han encontrado tanto en mamíferos como en anfibios y peces.

Se ha propuesto que el ancestro de UCP1 probablemente tenía una función antioxidante. Después de la duplicación del gen ancestro de UCP1 tuvo lugar una cooptación génica. Este fenómeno se produce cuando la selección natural encuentra nuevos usos para los genes existentes. Debido a la existencia de la UCP2 y UCP3, la UCP1, pudo liberarse de su función primordial y ha evolucionado para cumplir una función más específica como es la termogénesis en el tejido adiposo pardo.

El análisis filogenético revela que hay genes ortólogos de UCP1 en peces, anfibios y mamíferos. Sin embargo, la actividad termogénica de la proteína se ha observado solamente en mamíferos euterios (o placentarios). De este dato se deduce que la larga rama filogenética que ha llevado a la UCP1 en los placentarios sufrió variaciones en la estructura de la proteína que han sido acompañados por cambios funcionales (Hughes, Jastroch et al. 2009). Como ejemplo se puede citar el Glu 134, presente en el segundo dominio, que es el residuo que comparten los mamíferos euterios y que confiere a la UCP1 la capacidad de conducir protones a través de la membrana interna mitocondrial (Jimenez-Jimenez, Zardoya et al. 2006). De hecho, tanto en mamíferos no euterios como en las otras UCPs, se ha encontrado que, en lugar del Glu 134 es presente un aspartato. Curiosamente, con este cambio no se detecta una conductancia basal a protones sensible a nucleótido.

Hay que tener en cuenta que el tejido adiposo pardo se encuentra solamente en los mamíferos euterios, exactamente donde se ha detectado la función termogénica de UCP1. A diferencia del tejido adiposo blanco no se puede considerar un tejido de almacenamiento de reservas energéticas en forma de triglicéridos. Si antes se creía que su precursor era la célula preadipocítica, ahora se ha puesto de manifiesto que el

precursor del TAP es el tejido muscular, habiéndose encontrado que estos dos tejidos comparten el mismo linaje miogénico (Seale, Bjork et al. 2008). Por tanto, la aparición del TAP en mamíferos euterios ha coincidido con la evolución de la UCP1 para adquirir la función termogénica.

Debido a que las UCP4 y UCP5 se encuentran más distantes del punto de vista evolutivo, en los siguientes apartados se analizarán solamente la UCP1, UCP2 y UCP3.

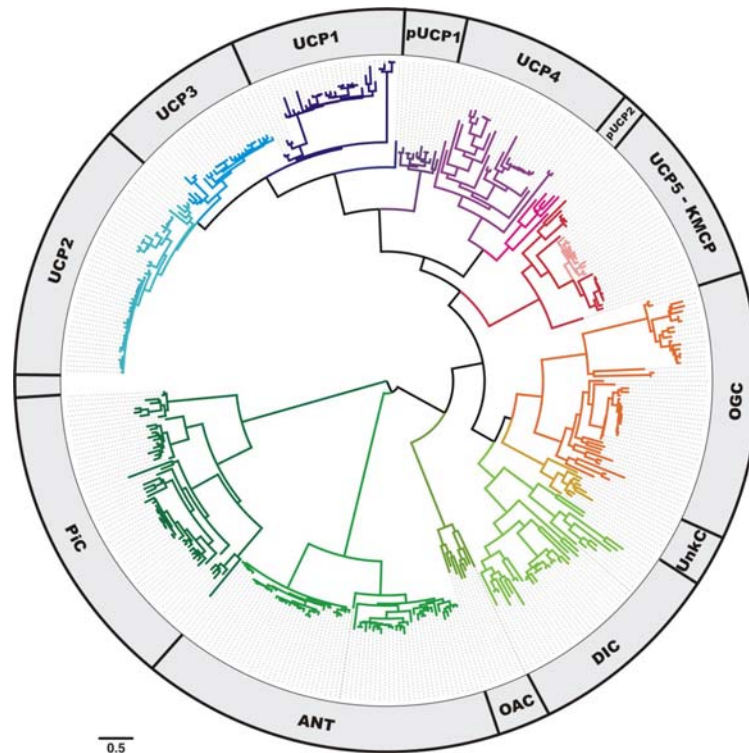


Fig. 17. Árbol filogenético de las UCPs. Este árbol filogenético circular representa la línea evolutiva de las UCPs y de aquellos transportadores mitocondriales de mayor homología con las UCPs. **PiC** corresponde al transportador de fosfato, **ANT** la translocasa de nucleótido, **OAC** transportador de oxaloacetato, **DIC** transportador de dicarboxilatos, **UnkC** transportador con función desconocida, **OGC** transportador de oxoglutarato, **KMCP** proteína transportadora específica de riñón, **pUCP1** UCP1 de plantas y **pUCP2** UCP2 de plantas. Imagen adaptada de Luévano-Martínez et al., [2009].

2.3 ESTRUCTURA GÉNICA DE LAS UCPs DE MAMÍFEROS

En humanos el gen de la UCP1 se localiza en el brazo largo del cromosoma 4, mientras que en ratón se encuentra en el cromosoma 8 y en rata en el 19 (Ricquier and Bouillaud 2000; Ledesma, de Lacoba et al. 2002). El gen se compone de seis exones que codifican cada uno por una hélice transmembranal y presenta las posiciones de los intrones altamente conservadas.

A nivel molecular existen distintas moléculas que son potentes activadores de la expresión del gen de la UCP1, como las catecolaminas (vía AMPc), las hormonas tiroideas, los ácidos grasos, el ácido retinoico y los receptores que activan la proliferación de los peroxisomas (PPAR). Todos ellos actúan directamente sobre un elemento activador de unos 211 bp que se sitúa antes de la transcripción (Cassard-Doulcier, Gelly et al. 1993). La organización de este elemento activador es compleja y en él se han localizado los diversos sitios de unión de los distintos activadores. Tanto los elementos de respuesta a AMPc y ácido retinoico más importante, como la secuencia que le confiere la especificidad tisular y una zona donde se supone que se unen PPARs, se encuentran localizados en un elemento regulador de unos 90 bp. Se ha observado también que otras moléculas como la insulina, TNF α , glucocorticoides y IGF-1 regulan su expresión de forma indirecta (Ricquier and Bouillaud 2000).

Es importante resaltar que en los últimos años se ha demostrado que los PPAR ejercen un importante papel en la regulación de los genes UCP1, UCP2 y UCP3. En el TAP se expresan tres subtipos de la familia de PPAR: PPAR α , PPAR γ y PPAR δ . De estos, el PPAR γ es responsable de inducir la diferenciación de los adipocitos marrones, puesto que regula la expresión de distintos genes implicado en la adipogénesis y en el metabolismo lipídico. La expresión del coactivador transcripcional 1 α de PPAR γ (PGC-1 α) se induce en respuesta a la termogénesis y en este contexto parece estar implicado en la activación del gen de UCP1 (Barbera, Schluter et al. 2001).

El gen de la UCP2 se encuentra localizado en el cromosoma 11q13 en humanos y en el cromosoma 7 en ratones (Fleury, Neverova et al. 1997). Presenta seis exones codificantes y uno en el extremo 5' que no se traduce (Ricquier and Bouillaud 2000). La transcripción del gen empieza en el exón 3 (Pecqueur, Cassard-Doulcier et al. 1999). Al contrario de UCP1, el promotor de la UCP2 no presenta ni caja CAAT ni TATA, sino motivos de unión de la caja CCAAT y de la caja Y, además de una secuencia rica en GC (Yamada, Hashida et al. 1998).

Tanto a nivel transcripcional, como a nivel traduccional la proteína esta estrechamente regulada. En el primer caso, en regiones cercanas al promotor se encuentran sitios de unión a factores de transcripción como Sp1, AP-1, AP-2 y receptores de la familia PPAR (Ricquier and Bouillaud 2000). En este caso, se ha demostrado que la PPAR α y PPAR δ regulan la expresión del gen de UCP2 en el músculo esquelético y corazón (Villarroya, Iglesias et al. 2007).

Recientemente se ha visto que también la proteína SREBP-1c induce la transcripción de UCP2 (Takahashi, Motomura et al. 2005) y que Sirt-1 la inhibe uniéndose a su

promotor (Moynihan, Grimm et al. 2005). Es probable que la interacción de los ácidos grasos con estos receptores pueda potenciar la transcripción del gen UCP2.

A nivel traduccional está descrito que cambios en los niveles de ARN mensajero no necesariamente están acompañados de cambios en los niveles de proteína y viceversa (Pecqueur, Alves-Guerra et al. 2001; Hurtaud, Gelly et al. 2006). Esto es debido a la existencia de una secuencia no codificante de 36 aminoácidos localizada en la posición 5' de la región de marco de lectura abierto (del inglés *open reading frame*), altamente conservada entre las distintas especies (Jastroch, Withers et al. 2004). La delección de esta secuencia aumenta la traducción de la UCP2, sugiriendo que tenga algún papel sobre la regulación traduccional de la proteína (Pecqueur, Alves-Guerra et al. 2001; Ledesma, de Lacoba et al. 2002).

En humanos y ratones, los genes de la UCP2 y la UCP3 se encuentran separados por pocas Kb. En concreto el gen de la UCP2 se localiza a unos 20 kb *downstream* del codón stop del gen de la UCP3. La organización génica es, por tanto, similar a la UCP1 y UCP2. Presenta seis exones codificantes y dos exones situados en el extremo 5' que no se traducen (Ricquier and Bouillaud 2000).

En humanos puede codificar para dos isoforma: UCP3_L consta de 312 aminoácidos, mientras UCP3_S consta únicamente de 275 aminoácidos, ya que carece del último dominio transmembrana. A nivel de regulación transcripcional se ha descrito una fuerte dependencia de los promotores humanos y de ratón del gen de UCP3, del factor de transcripción biogénico MyoD. Sin este, el promotor es insensible al estímulo mediado por PPAR, el ácido retinoico o las hormonas tiroideas (Solanes G, 2005). Como en el caso de la UCP2, también la UCP3 es regulada por la PPAR α y PPAR δ en el músculo esquelético y corazón.

2.4 REGULACIÓN A NIVEL MOLECULAR DE LAS UCPs

Como mencionado anteriormente, la UCP1 desacopla la respiración disminuyendo la eficiencia energética para producir calor durante la termogénesis sin tiritación. Sin embargo, en condiciones normales (no termogénicas), la respiración en las mitocondrias del TAP está acoplada a la síntesis de ATP. De esto se deduce que la actividad de la UCP1 debe estar altamente regulada. Actualmente se conocen los reguladores a nivel molecular solamente de UCP1, mientras que la regulación de la actividad de las proteínas UCP2 y UCP3 no se ha determinado aún con exactitud.

2.4.1 Los nucleótidos de purina

Los nucleótidos de purina di y trifosfato son capaces de inhibir el transporte de protones a través de la UCP1. Las afinidades por los nucleótidos varían de la siguiente manera: GTP>GDP>ATP>ITP>ADP>IDP (Heaton, Wagenvoord et al. 1978; Klingenberg 1988). Su unión es altamente dependiente del pH. Para valores de pH superiores a 6.5 su afinidad disminuye conforme aumenta el pH. Mientras que para valores inferiores a 6.5, la unión de los nucleótidos es independiente del pH (Klingenberg and Winkler 1985).

Las primeras aproximaciones para localizar el sitio de unión del nucleótido a la UCP1 se basan en experimentos de fotoafinidad que detectaron la zona de marcaje en el tercer *loop* matricial (Winkler and Klingenberg 1992). A raíz de esta observación, se propuso que el nucleótido, desde el espacio intermembrana, atraviesa la membrana hasta el *loop* matricial, donde la región 261-269 parece estar implicada en el reconocimiento de los nucleótidos libres (Bouillaud, Casteilla et al. 1992). En concordancia con este modelo, mediante experimentos de mutagénesis dirigida se vio como la delección de la región 267-269 producía una proteína que carecía de regulación por nucleótido (Bouillaud, Arechaga et al. 1994). Trabajos posteriores demostraron que no solamente el tercer *loop*, sino que los tres *loops* matriciales estaban implicados en la unión de los nucleótidos, y por tanto, en la regulación del transporte a través de UCP1 (Gonzalez-Barroso, Fleury et al. 1999).

De acuerdo con estos datos, el grupo de Rial ha propuesto un modelo de unión según el cual el nucleótido penetraría en el barril de hélices α por el lado citosólico, llegando hasta la parte más profunda de la proteína. En este lugar el nucleótido interaccionaría con los tres *loops* que formarían un bolsillo hidrofóbico donde se aloja el anillo de purina, mientras que la cadena polifosfato estaría orientada hacia el centro del barril. De este modo las cargas negativas interaccionarían con los residuos de arginina 83, 182 y 276 presentes en los segmentos transmembranas II, IV y VI (Ledesma, de Lacoba et al. 2002).

La gran homología existente entre la UCP2 y la UCP3 con la UCP1 llevó a varios autores a buscar los posibles reguladores fisiológicos de la UCP2 dentro de los conocidos para la UCP1. Algunos autores, como el grupo de Casteilla, demostraron que el GDP era capaz de aumentar el potencial de membrana en mitocondrias que expresan UCP2 y que esto llevaba al aumento de ROS (Negre-Salvayre, Hirtz et al. 1997). De manera análoga, otros autores observaron en sistemas reconstituidos, que la actividad transportadora de la UCP1, UCP2 y UCP3 era inhibida por nucleótidos de purina de

forma similar (Jaburek and Garlid 2003). Sin embargo no existe consenso ya que otros autores no han observado ningún efecto de los nucleótidos sobre la actividad desacoplante mediada por la UCP2 (Rial, Gonzalez-Barroso et al. 1999) y UCP3 (Zhang, Hagen et al. 1999).

2.4.2 Los ácidos grasos

Los ácidos grasos desacoplan la fosforilación oxidativa y durante muchos años se pensó que lo hacían de manera similar a la producida por otros desacoplantes típicos (Wojtczak and Schonfeld 1993). Sin embargo, esto se desmintió desde que Skulachev y su grupo demostraron que el carboxiatractilato (CAT) inhibía parcialmente el desacoplamiento inducido por los ácidos grasos, apuntando a que la translocasa de nucleótido participa en la acción desacoplante de los ácidos grasos. Este comportamiento se ha podido comprobar no sólo con la ANT sino también con otros transportadores como el AGC, el PiC o las propias UCPs (Rial, Aguirregoitia et al. 2004).

La UCP1 presenta mayor afinidad hacia los ácidos grasos que el resto de los transportadores en concordancia con la regulación fisiológica de su actividad. A pesar de que todavía no ha sido localizado el sitio de unión del ácido graso a la proteína, Hagen y Lowell, trabajando con quimeras UCP1/UCP3, demostraron que la activación del transporte de H^+ por ácidos grasos en la UCP1 depende del dominio II o de algunos de sus residuos que se encuentran ausentes en la UCP3. (Hagen and Lowell 2000). De acuerdo con estos datos, en el año 2006 Jiménez-Jiménez y colaboradores demostraron que el *loop* hidrofílico que conecta los dominios transmembrana 3 y 4 confiere a la UCP1 una mayor afinidad hacia los ácidos grasos que el resto de las UCPs. De hecho, la estimulación por ácidos grasos va disminuyendo de forma progresiva según se van cambiando los aminoácidos de este dominio por sus correspondientes en la UCP2 o UCP3. (Jimenez-Jimenez, Ledesma et al. 2006).

Es importante señalar también que Rial y colaboradores consiguieron demostrar que el ácido retinoico es capaz de aumentar la conductancia a protones actuando de manera directa sobre UCP1 (Rial, Gonzalez-Barroso et al. 1999). Teniendo en cuenta que el ácido retinoico es un inductor del gen de UCP1 y que las concentraciones requeridas para observar esta activación estaba en un rango fisiológico, se ha propuesto que los retinoides pueden constituir una segunda vía de estimulación de la termogénesis en el TAP (Bouillaud, Couplan et al. 2001). De manera análoga a lo observado para la UCP1, este mismo grupo, utilizando mitocondrias aisladas de levadura, observaron que el ácido *todo-trans* retinoico activaba también la UCP2 (Rial, Gonzalez-Barroso et al. 1999). Sin

embargo dicha activación era distinta de la observada para la UCP1 porque era extremadamente dependiente del pH. A pH 7.4 se observaba una actividad máxima desacoplante, mientras que a pH igual o inferior a 7.0 esta actividad desaparecía.

Si el papel de los ácidos grasos como reguladores fisiológico de la UCP1 está bien aceptado, actualmente no hay consenso sobre el mecanismo molecular por el cual la UCP1 es activada. Existen dos modelos que tratan de explicar el mecanismo (Ricquier and Bouillaud 2000; Rial and Gonzalez-Barroso 2001), el primero, llamado ciclo protonofórico de los ácidos grasos, se basa en la capacidad de la mayoría de los transportadores mitocondriales de transportar aniones, y postula que los ácidos grasos entran en la mitocondria por difusión a través de la membrana en su forma protonada mediante un mecanismo de *flip-flop* (Fig. I8, B). El H^+ es liberado en la matriz, disipando el gradiente de potencial electroquímico de protones. Los ácidos grasos son transportados en su forma aniónica por la UCP1 hacia el lado citosólico. El resultado es por tanto la transferencia de un protón en la matriz (Garlid, Orosz et al. 1996). La segunda hipótesis propone que no hay transporte de los ácidos grasos a través de la membrana, sino que se unirían a un sitio de la proteína actuando como grupo prostético. Su grupo carboxilo actuaría transfiriendo los protones a los aminoácidos del canal de translocación, desde donde serían translocados a la matriz (Fig. I8, A) (Rial and Nicholls 1983; Winkler and Klingenberg 1994).

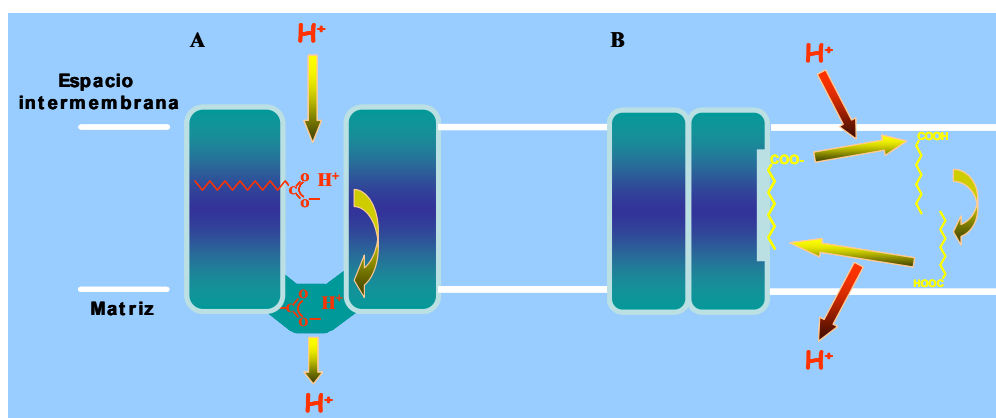


Fig. I8. Modelos propuestos para el mecanismo de acción de los ácidos grasos sobre la UCP1. (A) Modelo propuesto por Rial et al., [1983] (B) Modelo protonofórico propuesto por Garlid et al., [1996].

Si bien en ambos modelos el resultado final es el transferimiento de un protón en la matriz, existen evidencias que invalidan el modelo protonofórico. Estas evidencias se basan en la incapacidad de los alquilsulfonatos y los retinoides de hacer *flip flop*, aunque sean transportados por la UCP1. En el caso de los alquilsulfonatos, el undecanosulfonato es un análogo de los ácidos grasos, pero al ser el pKa del grupo sulfónico más ácido que el grupo carboxilo, no se protona a pH fisiológico (Garlid, Orosz et al. 1996). Esta es una condición imprescindible para que el undecanosulfonato

pueda hacer *flip flop* y, por tanto, completar el ciclo protonofórico. Sin embargo, Rial y colaboradores han demostrado que el undecanosulfonato aumenta la conductancia a protones y es inhibible por GDP (Rial, Aguirregoitia et al. 2004). En el caso de los retinoides, la mayoría posee un grupo voluminoso alejado del grupo carboxilo que le impide hacer *flip-flop*. Sin embargo, son potentes activadores de la UCP1 (como el TTNPB) (Tomas, Jimenez-Jimenez et al. 2004), incluso más que el palmitato.

Basándose en el modelo del ciclo protonofórico propuesto por Garlid, algunos autores han propuesto que la UCP3 podría estar implicada en el transporte de ácidos grasos desde la matriz hacia el espacio intermembrana (Himms-Hagen and Harper 2001). La hipótesis que se plantea es que cuando el aporte de ácidos grasos excede la capacidad mitocondrial para ser oxidado, se acumula acil-CoA en la mitocondria. La enzima acil-CoA tioesterasa rompe esta molécula en ácidos grasos y CoA. De este modo, el CoA puede volver a estar disponible para el ciclo de Krebs y la β -oxidación, mientras que la UCP3 se encargaría de exportar los aniones de los ácidos grasos desde la matriz hacia el espacio intermembrana, donde serían reactivados por la acil-CoA sintasa. Esto garantiza disponibilidad de CoA y una alta tasa de oxidación de los ácidos grasos. Una hipótesis relacionada sugiere que, cuando existe un elevado aporte de ácidos grasos, el gradiente de pH facilita su acumulación en el interior de la mitocondria, donde ejercen un efecto toxico. En este caso la UCP3 mediaría el transporte de los aniones de los ácidos grasos desde la matriz hacia el espacio intermembrana. De este modo, por un lado se permite que se mantenga una alta tasa de oxidación de los ácidos grasos, y por otro lado, se evita que su acumulación en la matriz genere un daño mitocondrial (Schrauwen and Hesselink 2004).

Sin embargo, cabe reseñar que recientemente, los mismos autores que postularon este modelo, han determinado que a partir de mitocondrias de músculo esquelético de ratón UCP3 *knockout* y *wild type* no se observan diferencias significativas en la exportación de los ácidos grasos en forma aniónica desde la matriz mitocondrial entre ambos genotipos (Seifert, Bezaire et al. 2008). Además, tampoco la tasa de oxidación de ácidos grasos manifiesta variaciones importantes entre los dos genotipos comparados. Estos datos apuntan a que la UCP3 no tiene un papel esencial en el transporte y oxidación de los ácidos grasos.

2.4.3 Las especies reactivas del oxígeno

Un numero creciente de trabajos apunta a que las UCPs podrían estar implicada en el control de la producción de ROS en la célula (Echtay 2007). Esto empujó algunos grupos a investigar si las ROS pudieran regular la actividad de las UCPs.

2.4.3.1 Regulación de la actividad de las UCPs por el superóxido

En el año 2002 el grupo de Brand mostró que el $O_2^{\cdot -}$ activaba la UCP1, UCP2 y UCP3 de manera específica (Echtay, Roussel et al. 2002). Se determinó inicialmente el efecto del superóxido sobre la actividad de UCP1 en mitocondrias a partir del TAP de rata. Posteriormente, debido a la existencia de otras UCPs en este tejido, se estudió también el efecto en mitocondrias de levaduras. En ambos casos se mostró el papel activador del $O_2^{\cdot -}$ sobre la conductancia mitocondrial mediada específicamente por esta proteína. Para la UCP2, se analizó la activación por superóxido tanto en mitocondrias aisladas a partir de hígado y corazón que no expresan UCP2, como mitocondrias aisladas de células β , riñón y bazo, que si expresan la UCP2. En el primer caso no se observaron cambios en la conductancia a protones en presencia de superóxido, mientras que en el segundo caso si se detectó un aumento en la conductancia. En el caso de UCP3, se comprobó el papel activador del anión superóxido en mitocondrias aisladas a partir de músculo esquelético de ratas deficientes en el gen de UCP3 y ratas silvestres. Los resultados mostraron que la conductancia a protones aumentaba únicamente en las mitocondrias que expresaban la UCP3. Este grupo determinó que en todos los casos dicha activación requería la presencia de ácidos grasos y se inhibía en presencia de nucleótidos de purina, por lo que concluyó que el superóxido activaba las UCPs.

2.4.3.2 Regulación de la actividad de las UCPs por el 4-hidroxinonenal

Murphy y colaboradores propusieron que la activación inducida por el superóxido sobre las UCPs compartía con el HNE la misma vía de señalización (Murphy, Echtay et al. 2003). En este caso el $O_2^{\cdot -}$ producido endógenamente en la matriz reaccionaría tanto con los centros Fe-S de algunas proteínas como la aconitasa, liberando el catión Fe^{2+} , como con la MnSOD produciendo peróxido de hidrogeno. El Fe^{2+} y H_2O_2 al reaccionar entre si mediante la reacción de Fenton darían lugar a OH^{\cdot} . Este radical promovería la peroxidación lipídica y la formación de aldehídos como el HNE, que activa directamente las UCPs (Fig. I9).

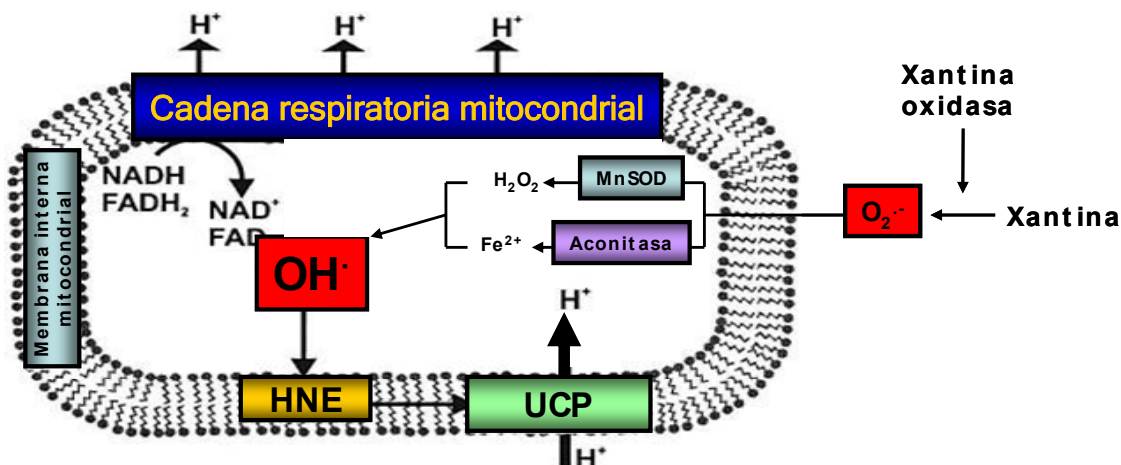


Fig. 19. Modelo de activación de las UCPs por ROS. En este esquema se resalta el mecanismo común de activación de las UCPs por parte del superóxido y del HNE. Imagen adaptada de Echta y et al. [2003].

En concordancia con este modelo, Echta y colaboradores mostraron que el HNE podría ser un activador común de las UCP1, UCP2 y UCP3 (Echta, Esteves et al. 2003).

Como en el caso del superóxido, se estudió la activación de la UCP1 por el HNE tanto en mitocondrias a partir del TAP como en mitocondrias de levaduras. En ambos casos se detectó un aumento de la conductancia a protones mediado específicamente por la UCP1, y además se vio que dicho efecto era revertido en presencia de GDP. La activación de la conductancia a los protones mediada por la UCP2 e inducida por el HNE se determinó mediante el aislamiento de mitocondrias de ratones a partir del riñón, del hígado y del corazón. La activación inducida por el HNE era inhibida por el GDP en mitocondrias de riñón, mientras que no se observó dicha inhibición en mitocondrias de hígado o corazón (donde no se expresa UCP2). Para la UCP3 se observó que el HNE aumentaba la conductancia a protones a través de la UCP3. Comparando mitocondrias aisladas a partir de músculo esquelético de ratas deficientes en el gen de UCP3 y ratas silvestres se pudo comprobar que este efecto se detectaba solamente en la mitocondrias que expresaban la UCP3.

El aumento de la conductancia que se observó en los tejidos que no expresan la UCP2, sugirió que probablemente otro transportador estaba implicado en el aumento de la conductancia a protones. En este sentido, se vio que el carboxiactratilato producía siempre una inhibición del aumento en la conductancia a los protones inducido por HNE, independientemente del origen tisular de las mitocondrias y su correspondiente expresión de las UCPs. Por lo que se concluyó que la ANT estaba implicada en este proceso.

De acuerdo con estas observaciones, se propuso que las UCPs y la ANT podrían formar parte de los sistemas de protección frente al estrés oxidativo (Echtay, Esteves et al. 2003). Ante un aumento de ROS se produce la peroxidación lipídica, generándose el HNE. Este compuesto induciría la activación de UCP y ANT, provocando un ligero desacoplamiento de la respiración que comporta el aumento del consumo de oxígeno y la disminución de potencial de membrana. El resultado sería una disminución de la formación de ROS, y por tanto, del estrés oxidativo según un mecanismo de retroalimentación negativa (Fig I10).

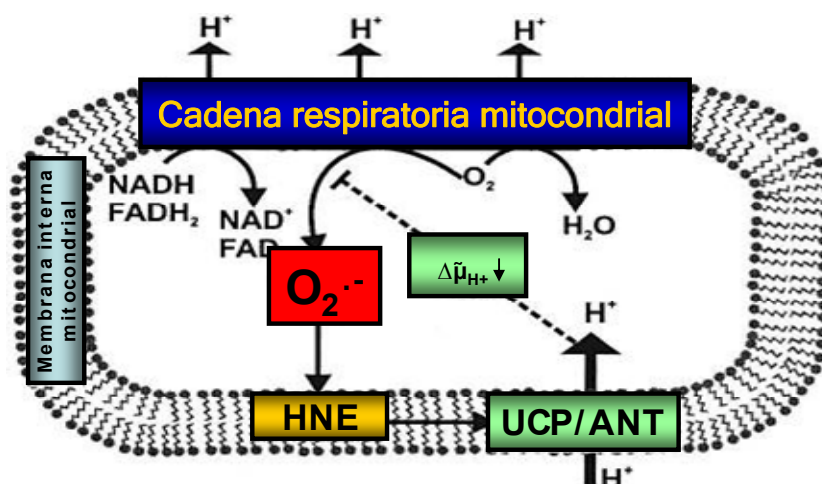


Fig. I10. Modelo de activación de la ANT y las UCPs por el HNE. El aumento de ROS induce la activación conjunta de la ANT y las UCPs que condeuce a la disminución de ROS, según un mecanismo de retroalimentación negativa. Imagen adaptada de Echtay et al. [2003].

Curiosamente, se observó que el efecto inhibitor de GDP y CAT no era acumulativo, es decir no aumentaba cuando se añadían estos dos compuestos al mismo tiempo en las mitocondrias aisladas de los tejidos analizados. De hecho las dos proteínas ANT y UCP2 respondían por igual a la inhibición, tanto en presencia de los dos compuestos por separados, como en presencia de los dos compuestos al mismo tiempo. Este efecto resultaba difícil de explicar, porque si el GDP y el CAT son dos inhibidores específicos por cada proteína, sería lógico deducir que los dos inhibidores juntos tendrían que ejercer una inhibición mayor. Este grupo justificó esta discrepancia postulando que la ANT y las UCPs probablemente formaban un dímero que era sensible a los dos inhibidores por igual.

Sin embargo, algunos autores han postulado que probablemente este efecto era atribuible a una única proteína (Cannon, Shabalina et al. 2006). Puesto que se ha demostrado que el GDP interacciona con la ANT (Samartsev, Simonyan et al. 2000; Khailova, Prikhodko et al. 2006) y que este transportador mitocondrial tiene uno niveles de expresión 100 veces mayor en los tejidos analizados con respecto a las UCPs, se

dedujo que los cambios en la conductancia a protones dependían en gran medida de la ANT, mientras que la contribución de las UCPs era (si había) imperceptible (Brand, Pakay et al. 2005).

Además, otros grupos criticaron que el efecto del superóxido observado en el riñón se pudiera atribuir a la UCP2 (Couplan, del Mar Gonzalez-Barroso et al. 2002), puesto que la dificultad de poseer un buen anticuerpo que reconociese la proteína UCP2 de forma específica llevó a algunos grupos a debatir si en el riñón se expresaba o no UCP2 (Krauss, Zhang et al. 2003). Si bien está confirmado que el ARNm de UCP2 se detecta en este tejido, la proteína no ha sido detectada. Por lo tanto parece probable que el efecto desacoplante observado en el riñón dependa de la ANT y no de la UCP2.

PARTE 3

ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS DE LA UCP2

3.1 POSIBLE PAPEL DE LA UCP2 EN LA CÉLULA

Doce años después de su descubrimiento y a pesar de que la numerosa bibliografía que se halla sobre la UCP2, existe mucha controversia sobre cual sea su función biológica. Sin embargo, hay cada vez más evidencias que apuntan a que esta proteína podría actuar como un sistema de protección frente al estrés oxidativo (Brand, Affourtit et al. 2004; Krauss, Zhang et al. 2005; Nedergaard, Ricquier et al. 2005). En esta parte de la Introducción se tratará de analizar los principales papeles de la UCP2 en la fisiopatología celular postulados hasta ahora.

3.1.1 Papel de la UCP2 en el estrés oxidativo

Se ha propuesto que un ligero desacoplamiento mediado por la UCP2 permite que la velocidad de la respiración se acelere, así de permitir que no haya una elevada producción de anión superóxido.

En los primeros estudios que se realizaron en ratones *knockout* para la UCP2 se observó que eran resistentes a la infección por *Toxoplasma gondii*, un parásito intracelular que infecta letalmente al cerebro de los ratones. Estos autores determinaron que la producción de ROS por parte de los macrófagos se encontraba incrementada, confiriendo a estas células mayor capacidad para resistir al parásito (Arsenijevic, Onuma et al. 2000). El macrófago en condiciones basales presenta unos altos niveles de UCP2, mientras que cuando empieza su acción germicida se asiste a una rápida

generación de superóxido (estallido respiratorio), que se acompaña con una disminución progresiva en los niveles de UCP2, por lo que esta proteína parece tener un papel relevante en regular la formación de ROS. Posteriormente, otros estudios realizados en ratones *knockout* para la UCP2 demostraron la implicación de la proteína en el estrés oxidativo. En este sentido, el grupo de Casteilla vio como los niveles de ROS aumentaban en células endoteliales a las cuales previamente se le había silenciado la UCP2 (Duval, Negre-Salvayre et al. 2002). Dos años más tarde otro grupo estudió como ratones UCP2^{-/-} que habían sufrido la extirpación parcial del hígado presentaban unos niveles de estrés oxidativo mayor que en los ratones *wild type* y además, presentaban una menor capacidad de regeneración del hígado (Horimoto, Fulop et al. 2004). Derdak y colaboradores vieron como en ratones UCP2^{-/-} se desarrollaba más fácilmente un cáncer de colon en condiciones de estrés oxidativo (Derdak, Fulop et al. 2006). Más recientemente Andrews y colaboradores publicaron un interesante estudio sobre la esperanza de vida de ratones UCP2^{-/-} en comparación con los ratones silvestre. De este estudio emergió que la esperanza de vida de los ratones silvestres es mayor. Además, demostraron también que los ratones que presentan una doble delección de los genes UCP2 y Mn-SOD viven menos tiempos que los ratones Mn-SOD^{-/-} (Andrews and Horvath 2009).

De forma simultánea a los trabajos que acabamos de citar, otros grupos propusieron que la UCP2 es una proteína implicada en la protección frente al estrés oxidativo analizando modelos de sobreexpresión de la proteína. Li y colaboradores sobreexpresaron la UCP2 en la línea celular INS-1 (un clon de las células β). Después de tratar estas células con peróxido de hidrógeno vieron que la sobreexpresión de UCP2 reducía los daños oxidativos provocados por este radical (Li, Skorpen et al. 2001). De manera análoga Bechmann y colaboradores determinaron que el aumento de ROS provocado por una lesión cerebral disminuían en aquellas neuronas que sobreexpresaban UCP2 (Bechmann, Diano et al. 2002). En otros trabajos realizados sobre cardiomiocitos, se probó que la sobreexpresión de UCP2 en dichas células prevenía la muerte celular inducida por H₂O₂ (Teshima, Akao et al. 2003). Más recientemente otros autores revelaron que la sobreexpresión de la UCP2 consigue prevenir la apoptosis causada por una hipertermia (Zhang, Shang et al. 2007).

Cabe destacar también los trabajos de distintos autores que demostraron como la expresión de la UCP2 se induce en respuesta a un aumento de la formación de ROS. En este sentido, Lee y colaboradores observaron que en presencia de TNF- α la expresión de UCP2 incrementaba proporcionalmente a un aumento de los niveles de ROS durante el proceso de regeneración de hígado (Lee, Li et al. 1999). Otros autores, en estudio de *microarrays*, señalaron que UCP2 aumentaba la expresión cuando se irradiaban células

B del sistema linfático con radiaciones ionizantes, las cuales obviamente producían un incremento de estrés oxidativo (Voehringer, Hirschberg et al. 2000). Experimentos posteriores evidenciaron que otros agentes prooxidantes como los ácidos grasos libres o los lipopolisacaridos aumentaban la expresión de UCP2 (Medvedev, Robidoux et al. 2002; Ruzicka, Skobisova et al. 2005). De manera similar se determinó en macrófagos que la UCP2 aumentaba su expresión durante tratamientos que producen superóxido mitocondrial como rotenona o antimicina, pero no respondía al superóxido producido fuera de la mitocondria o al H_2O_2 (Giardina, Steer et al. 2008).

Estos datos son una parte de la abundante bibliografía que existe actualmente sobre el papel de la UCP2 en el estrés oxidativo. Como se puede apreciar, la implicación de la UCP2 en la formación de ROS no es específica de ningún tejido en particular, sino que se observa en varios tipos celulares como células β , células tumorales o neuronas entre otros.

En conclusión, a raíz de estos estudios, se ha postulado que la UCP2 ejerce una acción sinérgica con el sistema antioxidante para prevenir que los niveles de ROS no sobrepasen el umbral fisiológico. Hay que resaltar que hasta ahora no se ha demostrado que la acción de la UCP2 sea crítica en la sobrevivencia de la célula. Este aspecto es importante porque significa que la UCP2 no es la principal defensa contra el daño oxidativo, pero es una de ellas (Cannon, Shabalina et al. 2006).

3.1.2 Papel de la UCP2 en la homeostasis del calcio

Es conocido que el calcio es un regulador clave para la célula. Bajas concentraciones intracelulares son necesarias para una correcta función celular, mientras pequeños aumentos de la concentración activan vías de señalización dependiente de Ca^{2+} como la contracción muscular, la activación de la exocitosis, etc. Debido a que este catión divalente no puede ser metabolizado como otros segundos mensajeros, la célula utiliza proteínas u orgánulos que unen o secuestran el calcio para garantizar el mantenimiento de la homeostasis del calcio y su regulación. La mitocondria es uno de estos orgánulos donde la entrada del calcio en la mitocondria es regulado por el $\Delta\psi_{H^+}$ de la membrana interna (Szabadkai and Duchen 2008), de acuerdo a la teoría quimio-osmótica de Mitchell.

Cuando la concentración de calcio citosolico es elevada, la mitocondria lo introduce rápidamente en la matriz a través del uniportador del calcio. En el equilibrio, este uniporte eléctrico del calcio conduciría a un elevado gradiente de concentración a través de la membrana interna. Sin embargo, esto no ocurre gracias a la existencia de vías

independientes de salida de este ión, que intercambian Ca^{2+} por Na^+ o Ca^{2+} por H^+ (Fig. I11). Puesto que las distribuciones en equilibrio que proporcionan las vías de salida son diferentes de las que proporciona el uniporte, se produce un reciclaje lento pero continuo de este ión a expensas de un ligero consumo de $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$. La enorme capacidad de la mitocondria para almacenar Ca^{2+} es posible gracias a la presencia de fosfato (Pi), que es introducido en la matriz en respuesta al elevado ΔpH que se genera con la entrada del calcio en la matriz, con consiguiente disminución del $\Delta\psi$ (Nicholls and Chalmers 2004). El Pi en este caso no sólo disipa el gradiente de pH , sino que aumenta el $\Delta\psi$ favoreciendo la entrada del calcio en la mitocondria y forma $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ en la matriz permitiendo un mayor almacenamiento de calcio.

Del punto de vista fisiológico, el calcio tiene una gran relevancia en el metabolismo de la mitocondria, puesto que regula la actividad de tres enzimas claves del ciclo de Krebs, permitiendo un aumento en la producción de ATP (McCormack, Halestrap et al. 1990):

- Favorece la defosforilación del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa por parte de la piruvato deshidrogenasa fosfatasa.
- Aumenta la afinidad por el sustrato de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa.
- Disminuye la K_m de la NAD-isocitrato deshidrogenasa.

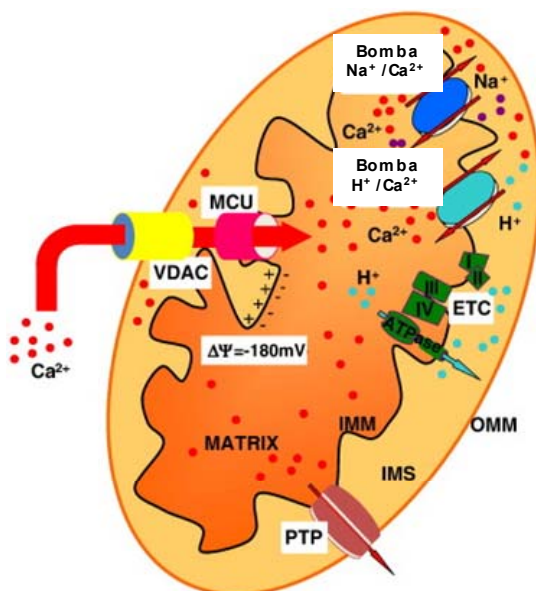


Fig. I11. Esquema del intercambio del calcio en la mitocondria. El calcio entra en la mitocondria a través de la porina (VDAC) y de un uniportador electrogénico (MCU), que actúa de acuerdo al gradiente de potencial electroquímico de protones de la membrana interna mitocondrial. El calcio sale de la mitocondria a través de las bombas $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$. Este continuo intercambio garantiza la correcta homeostasis de este ión. El PTP puede tener doble papel. Una apertura rápida permite la salida del calcio, mientras que una apertura prolongada estimula vías proapoptóticas. OMM (membrana externa mitocondrial), IMM (membrana interna mitocondrial), ETC (cadena respiratoria mitocondrial), IMS (espacio intermembrana), PTP (poro de transición en la permeabilidad de la membrana). Imagen adaptada de Celsi et al., [2009].

A pesar de que el proceso de regulación de la entrada del calcio en la mitocondria es actualmente bien conocido, todavía no se sabe que proteínas estén implicadas (Kirichok, Krapivinsky et al. 2004). Recientemente se ha propuesto que la UCP2 podría tener la función de introducir el calcio en la matriz mitocondrial (Trenker, Malli et al. 2007). En

este estudio se sobreexpresó la UCP2 en células endoteliales y se vio como, en presencia de histamina (que aumenta la concentración de calcio citoplasmático), la capacidad de introducir el calcio por la mitocondria aumentaba. Para confirmar estos datos se utilizaron mitocondrias de hígado de ratón *knockout* para la UCP2. Con respecto a los ratones silvestres, vieron que la capacidad de la mitocondria para introducir calcio disminuía a la mitad, y además las mitocondria de hígado UCP2^{-/-} no respondían a rojo rutenio (que es un inhibidor de la entrada de calcio en la mitocondria).

Aunque estos datos parecían apuntar a que la UCP2 podría estar realmente implicada en el transporte del calcio hacia la mitocondria, numerosos grupos criticaron este modelo y encontraron en los datos publicados varias discrepancias (Brookes, Parker et al. 2008). La crítica más llamativa fue que el efecto de la UCP2 sobre el transporte del calcio en mitocondrias aisladas de hígado no es atribuible a UCP2 simplemente porque dicha proteína se expresa en este órgano en concentraciones irrelevantes para poder mostrar una actividad como la observada.

3.1.3 Papel de la UCP2 en el metabolismo de la glucosa

La incapacidad de demostrar la presunta actividad desacoplante de la UCP2 ha llevado a algunos autores a proponer un papel para la proteína que no fuera relacionado con esta actividad desacoplante. De acuerdo con esta hipótesis, recientemente se ha postulado que la UCP2 podría estar implicada en el metabolismo de la glucosa (Bouillaud 2009). Como se observa en la figura I12, el modelo sugerido señala que la UCP2 no es un transportador de protones, sino que su función en la célula es la de limitar la entrada del piruvato en la mitocondria. Esta limitación conllevaría que parte del piruvato se convirtiera en lactato, mientras que la oxidación de los ácidos grasos y de la glutamina aumentaría para mantener la demanda de ATP celular. Por tanto, la UCP2 promovería un cambio en el substrato oxidado (*switch* metabólico).

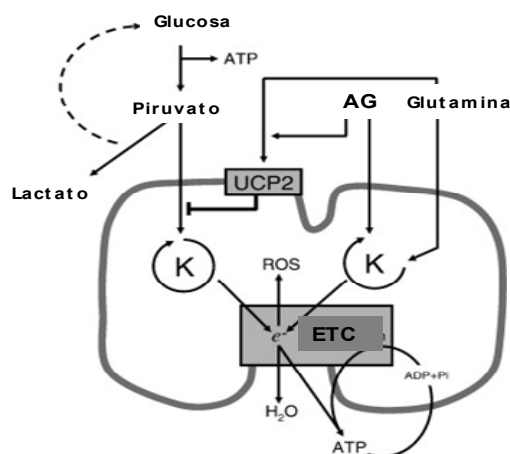


Fig. I12. Esquema de la posible función de la UCP2 en la regulación del metabolismo de la glucosa. La UCP2 impide que el piruvato entre en el ciclo de Krebs (K) favoreciendo la formación de lactato y la oxidación de la glutamina y de los ácidos grasos. ETC (cadena respiratoria mitocondrial), AG (ácidos grasos). Imagen extraída de Bouillaud [2009].

La posible implicación de la UCP2 en este contexto se propuso a raíz de algunos estudios realizados en ratones UCP2^{-/-}. En uno de ellos se determinó que en fibroblastos embrionarios de ratones *knockout* para el gen de UCP2 la oxidación de la glucosa y la proliferación celular eran mayores con respecto a fibroblastos embrionarios de ratones *wildtype* (Pecqueur, Bui et al. 2008). En concreto, se comprobó que la síntesis de ATP dependiente de glucosa era del 67% en los ratones silvestres, frente al 89% en el caso de los ratones deficientes en el gen de UCP2. De forma análoga, Nubel y colaboradores observaron en macrófagos UCP2^{-/-} que en presencia de glutamina había un menor coeficiente del control respiratorio y una acumulación de aspartato intracelular. Esto sugería que la UCP2 podría ser importante para una eficaz oxidación de la glutamina (Nubel, Emre et al. 2008).

3.2 IMPLICACIÓN DE LA UCP2 EN LAS PRINCIPALES PATOLOGÍAS

La posible implicación de la UCP2 en la protección frente al daño oxidativo ha hecho que diferentes autores hayan estudiado el papel de esta proteína en la etiología de distintas enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas o los desordenes metabólicos. Actualmente se ha vinculado la UCP2 en numerosos procesos patológicos, de los cuales a continuación se detallan los más importantes:

3.2.1 UCP2 en las enfermedades neuronales

En el sistema nervioso central se expresan principalmente tres isoformas de UCPs. En orden de niveles de expresión UCP5, UCP4 y UCP2. A pesar de esto, es UCP2 la que focaliza mayor atención en estudios sobre daño neuronal y enfermedades neurodegenerativas (Diano, Urbanski et al. 2000; Kim-Han and Dugan 2005).

La excitotoxicidad es el principal proceso implicado en el desarrollo de enfermedades neuronales. Consiste en la excesiva liberación de aminoácidos excitatorios como glutamato y sus análogos en el espacio presináptico. Este fenómeno se produce en situaciones de lesión cerebral aguda como por ejemplo un infarto isquémico. Sin embargo, las neuronas han desarrollado mecanismos endógenos neuroprotectores conocidos como preconditionamiento isquémico y tolerancia isquémica. Estos procesos permiten evitar la muerte neuronal y la UCP2 parece jugar un papel importante en esto.

Estos fenómenos fueron descritos en 1964 por Janoff que los definió como: fenómeno mediante el cual breves periodos de isquemia (precondicionamiento isquémico o PI) aplicados sobre un tejido determinado ponen en marcha una serie de mecanismos que

producen protección (tolerancia isquémica o TI) frente a un periodo isquémico mas grave, de mayor duración y próxima en el tiempo (Janoff 1964). Pero fue solo en 1990 cuando se observó que periodos cortos y no letales de isquemia en neuronas de hipocampo conferían tolerancia frente a un periodo isquémico posterior y más prolongado (Kitagawa, Matsumoto et al. 1990). A partir de entonces se han estudiado modelos *in vitro* e *in vivo* que han evidenciado la implicación de UCP2 en estos procesos (Mattiasson and Sullivan 2006).

Entre ellos cabe destacar el trabajo de Mattiasson y colaboradores en el cual se reveló que en cultivos neuronales que sobreexpresaban UCP2 había una tasa de mortalidad inferior cuando se eliminaba el oxígeno y la glucosa del medio. En el mismo trabajo, se evidenció *in vivo* que la expresión de UCP2 incrementaba dos veces después de provocar en ratones un episodio de preconditionamiento isquémico en la región del hipocampo (Mattiasson, Shamloo et al. 2003). De manera análoga otros autores observaron que la expresión de UCP2 aumenta en el tálamo después de un proceso isquémico (Deierborg, Wieloch et al. 2008). En concordancia con estos resultados, Diano y su grupo demostró que en células neuronales PC12 que sobreexpresan UCP2 había una prevención a la muerte provocada por agentes prooxidantes como H_2O_2 y oxido nítrico (Fig. I13) (Diano, Matthews et al. 2003).

Se ha postulado que el aumento de la expresión de UCP2 además de proteger frente al daño oxidativo, promovería un proceso de biogénesis mitocondrial para compensar la disminución de la síntesis de ATP debido a que la actividad desacoplante de la UCP2 disminuye la eficiencia energética (Diano, Matthews et al. 2003). De hecho, en neuronas de hipocampo, después de sufrir episodios de epilepsia, se encuentran un numero de mitocondrias mayor a lo normal (Blumcke, Zuschratter et al. 1999).

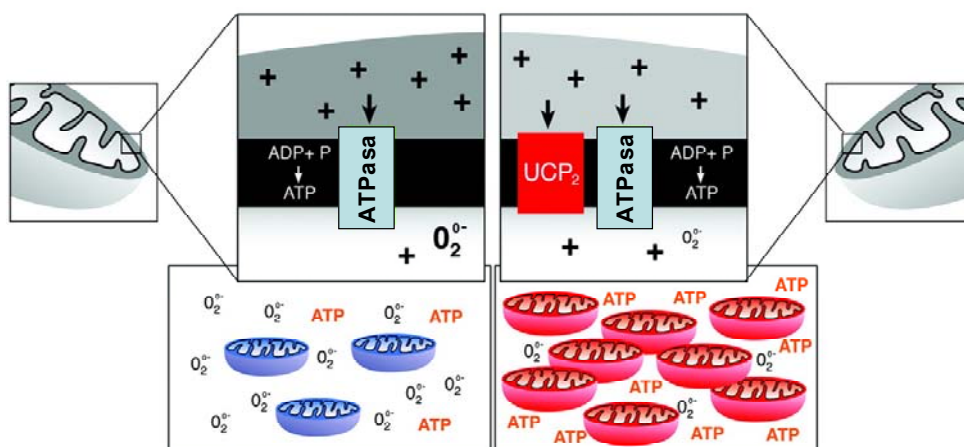


Fig. I13. Biogénesis mitocondrial en células neuronales. El aumento de los niveles de UCP2 en condiciones de estrés oxidativo promueve la mitocondriogénesis. Imagen extraída de Diano et al., [2003].

En definitiva, no obstante sean necesarias mayores aclaraciones sobre como realmente UCP2 se induzca en consecuencia a episodios de isquemia cerebral, se puede concluir que UCP2 podría tener un papel protector en la prevención de importantes neuropatologías como el Parkinson, la epilepsia o el Alzheimer.

3.2.2 UCP2 en el cáncer

Recientemente se ha focalizado la atención sobre la posible implicación de la UCP2 en el desarrollo de ciertos canceres. Este interés surgió a partir de algunos trabajos como el de Horimoto y colaboradores donde se estudió en distintos pacientes enfermos de cáncer de colon si la expresión de la UCP2 variaba con respecto a los tejidos no neoplásicos. De los resultados obtenidos afirmaron que la expresión de UCP2 en cáncer de colon es mayor que en el tejido colindante (zona peritumoral). Este aumento correspondía a 4 veces sea en mRNA que en expresión de la proteína. Este dato se determinó también a través del análisis histológico, donde se confirmó que la expresión de UCP2 era mayor en el tejido tumoral (Horimoto, Resnick et al. 2004). De acuerdo con este trabajo se propuso la existencia de una correlación entre la UCP2 y el desarrollo del tumor. Probablemente la célula cancerígena utiliza la UCP2 como parte de una respuesta adaptativa que modula el estrés oxidativo en el desarrollo de los canceres (Derdak, Fulop et al. 2006).

Otro aspecto que ha adquirido mucho interés en los tratamientos de los distintos canceres radica en la observación de que la UCP2 podría tener un papel importante en la resistencia al tratamiento de quimioterapia que tienen ciertas células cancerígenas. La terapia contra el conjunto de los canceres se basa en exponer las células tumorales a una serie de factores que limitan su supervivencia como carencia de nutrientes, hipoxia, isquemia y drogas antitumorales. Estos factores provocan una subida de los niveles de ROS en la célula (Hussain, Hofseth et al. 2003). Estos deberían provocar la activación de vías apoptóticas dependientes de un elevado estrés oxidativo, sin embargo, las células cancerígenas consiguen eludir esta situación gracias a un eficiente control de los niveles de ROS intracelulares (Hanahan and Weinberg 2000; Halliwell 2007). Este mecanismo está a la base de la ineficacia de los tratamientos de quimioterapia contra ciertos tipos de cáncer.

La posible implicación de la UCP2 en la ineficacia de los tratamientos anticancerígenos fue señalada por Harper y colaboradores, los cuales demostraron que en células tumorales aumenta la expresión de UCP2 y baja el potencial de membrana como mecanismo de defensa frente a agentes anticancerígenos que actúan provocando estrés oxidativo (Harper, Antoniou et al. 2002). Otro grupo también demostró como en células

de hepatocarcinoma humano, HepG2, la sobreexpresión de la UCP2 coincidía con una disminución de ROS y de la apoptosis inducida por distintos tratamientos (Collins, Jones et al. 2005). Se postula que la estrategia utilizada por la célula tumoral para controlar que los niveles de radicales libres no sobrepasen el umbral crítico se basa en desacoplar la respiración mitocondrial y la UCP2 podría ser utilizada por la célula tumoral para desacoplar la respiración cada vez que las ROS aumenten peligrosamente sus niveles (Derdak, Mark et al. 2008).

De acuerdo con estas observaciones, otra interesante hipótesis propuesta recientemente se basa en que la UCP2 podría estar relacionada con el “efecto Warburg” (Samudio, Fiegl et al. 2009). Este efecto se llama así porque Otto Warburg observó que las células cancerosas metabolizaban la glucosa de manera diferente a las células normales. Las células cancerosas tenían una tendencia a fermentar glucosa a lactato a pesar de que el oxígeno estaba disponible para la fosforilación oxidativa (Warburg 1956). Según esta teoría el efecto Warburg podría suponer un cambio metabólico, donde la oxidación de los ácidos grasos o de la glutamina es preferido a la oxidación de la glucosa. Estos cambios en el sustrato oxidativo confiere a las células tumorales una mayor resistencia a agentes proapoptóticos (Samudio, Fiegl et al. 2009).

Esta hipótesis es respaldada por algunos estudios donde se ha visto que la UCP2 podría estar implicada en el metabolismo de la glutamina (Nubel, Emre et al. 2008) y en el favorecer la oxidación de los ácidos grasos en contra de la utilización del piruvato (Pecqueur, Bui et al. 2008).

3.2.3 UCP2 en la diabetes

Como se refleja en figura I14, la correcta secreción de la insulina depende, en gran medida, del grado de acoplamiento de la fosforilación oxidativa (Antinozzi, Ishihara et al. 2002), por lo que la UCP2 podría ser un factor limitante en la secreción de esta hormona.

Este aspecto es respaldado por la abundante bibliografía que existe actualmente sobre la UCP2 en la célula β .

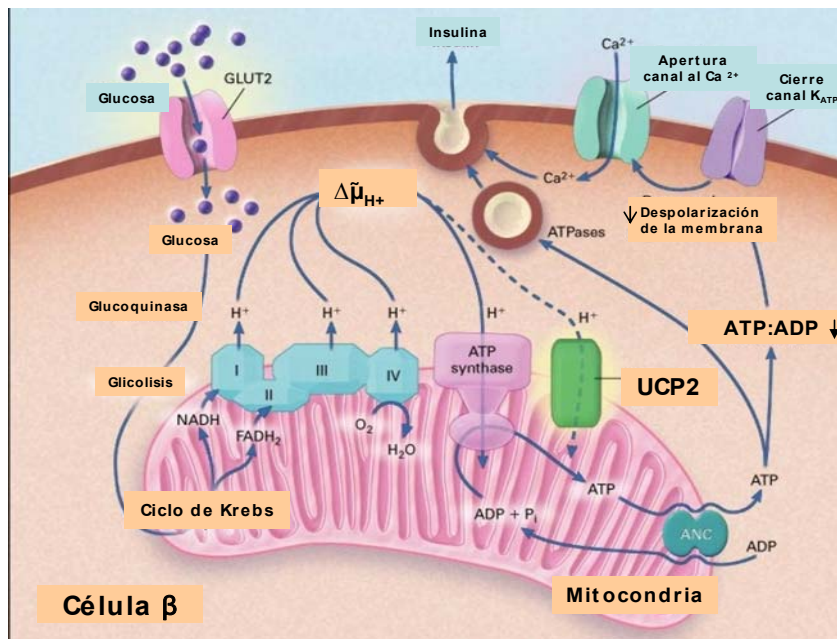


Fig. 114. Control de la secreción de insulina por parte de la UCP2.

En condiciones fisiológicas la apertura de los canales de potasio dependiente de ATP (K_{ATP}) presentes en la membrana plasmática causa su despolarización. La bajada del potencial de membrana plasmática esta acompañado por una entrada del calcio en la célula a través de los canales de Ca^{2+} presentes en la membrana misma. El calcio permite que la insulina sea liberada en el exterior de la célula. La UCP2 reduce la

eficiencia energética, provocando que el ratio ATP/ADP baje. Esto conduce a una menor apertura de los canales de potasio, menor entrada de calcio en la célula y finalmente se liberaría menos insulina. Imagen modificada de Langin et al, [2001].

En este sentido, Zhang y colaboradores aislaron islotes pancreáticos de ratones deficientes en UCP2 y vieron una hipoglucemia marcada, provocada por una elevada secreción de insulina. Cuando los mismos ratones se cruzaron con ratones ob/ob (ratones obesos, deficientes en el gen de la leptina), las crías recuperaban cierta capacidad de tolerancia a la glucosa (Zhang, Baffy et al. 2001). El mismo grupo, en trabajos posteriores, demostró que la inhibición de la UCP2 por genipina provocaba un aumento del potencial de membrana mitocondrial, del ATP citosólico y de la secreción de insulina (Zhang, Parton et al. 2006). Otros autores determinaron que en animales que sobreexpresaban SREPB-1c (que provoca lipotoxicidad), la inhibición de la UCP2, con el método de ARN de interferencia, mejoraba notablemente la secreción de insulina (Yamashita, Eto et al. 2004). Por otro lado, estudios llevados a cabo con modelos de sobreexpresión de la UCP2 han revelado una disminución en la secreción de insulina. Entre ellos conviene destacar dos trabajos donde se ha confirmado que la sobreexpresión de UCP2 en islotes pancreáticos o en células de insulinoma, determina una menor secreción de insulina (Chan, De Leo et al. 2001; Hong, Fink et al. 2001).

Debido a que la acción de UCP2 coincide con una menor secreción de insulina, se ha sugerido que podría ser un gen implicado en el desarrollo de la diabetes *mellitus* (Zhang, Baffy et al. 2001; Krauss, Zhang et al. 2005; Mattiasson and Sullivan 2006; Affourtit and Brand 2008). De acuerdo con esta hipótesis, se ha observado que, en condiciones de hiperglicemia e hiperlipidemia, la expresión de la UCP2 se encuentra aumentada (Lameloise, Muzzin et al. 2001; Laybutt, Sharma et al. 2002; Patane, Anello et al. 2002;

Krauss, Zhang et al. 2003). De manera parecida se vio que inhibiendo la UCP2 mediante ARN de interferencia, se obtenía un mejoramiento de los síntomas en modelos animales de diabetes (De Souza, Araujo et al. 2007).

También los estudio sobre los ratones UCP2^{-/-} han resultado muy útil en la comprensión del papel de la UCP2 en esta enfermedad. En este sentido se demostró que estos ratones son menos sensibles a los efectos diabetogénicos de una dieta hipercalórica y que las células β presentan una mayor sensibilidad a la glucosa y un elevado ratio ATP:ADP (Joseph, Koshkin et al. 2002; Joseph, Koshkin et al. 2004; Chan and Kashemsant 2006). Otros autores demostraron que en ratones UCP2^{-/-} la sensibilidad a la insulina mejora, a la vez que presentan una menor predisposición a desarrollar resistencia a la insulina después de seguir una dieta rica en grasa (Zhang, Baffy et al. 2001; Joseph, Koshkin et al. 2002; Joseph, Koshkin et al. 2004).

Si por un lado los trabajos sobre los ratones UCP2^{-/-} revelaron una mejoría al estado diabético, por otro los modelos de sobreexpresión de UCP2 revelan, como cabe esperar, un empeoramiento en la secreción de insulina en la célula β y una mayor frecuencia en el desarrollo de la diabetes tanto en modelos *in vivo* como en modelos *in vitro* (Chan, De Leo et al. 2001; McQuaid, Saleh et al. 2006). Algunos autores han propuesto también que la sobreexpresión de UCP2 provoca una hiperproinsulinemia. Debido a que la proinsulina para pasar a insulina depende del ATP, la UCP2 disminuye el ATP provocando que se acumule la proinsulina (Kashemsant and Chan 2006).

Del punto de vista genético, recientes estudios han enfocado el polimorfismo que existe en el promotor de UCP2 866G/A, responsable del aumento de la actividad transcripcional, como el causante de los efectos sobre la secreción de insulina. Este incremento de la UCP2 se asocia con disminución de la sensibilidad a la insulina, mal funcionamiento de las células β y un incremento severo de la diabetes (Esterbauer, Schneitler et al. 2001; Krempler, Esterbauer et al. 2002; D'Adamo, Perego et al. 2004; Sasahara, Nishi et al. 2004).

Hay que tener en cuenta que algunos autores sostienen que la inducción de UCP2 en la célula β responde al aumento de ROS en condiciones de hiperglucemia. Puesto que esta patología cursa con estrés oxidativo (Kajimoto and Kaneto 2004; Rolo and Palmeira 2006), es posible que la UCP2 se induzca para hacer frente al estado de estrés oxidativo crónico en el que se encuentra el enfermo (Joseph, Koshkin et al. 2004; Bai, Onuma et al. 2005; Pi, Bai et al. 2009). Esto produce como efecto indirecto que las célula β secreten menos insulina (Fig. I15). En concordancia con esta hipótesis, se ha observado recientemente que un aumento de la expresión de UCP2 no altera la secreción de

insulina, pero disminuye los niveles de ROS (Produit-Zengaffinen, Davis-Lameloise et al. 2007). Otro grupo ha visto que en ratones UCP2^{-/-} el estado de estrés oxidativo crónico desemboca en un incorrecto funcionamiento de las células β (Pi, Bai et al. 2009). En este caso el papel de UCP2 sería controlar la formación de ROS y su ausencia tendría como efecto la producción de las ROS en exceso que causarían una pérdida de la función celular y desordenes metabólicos.

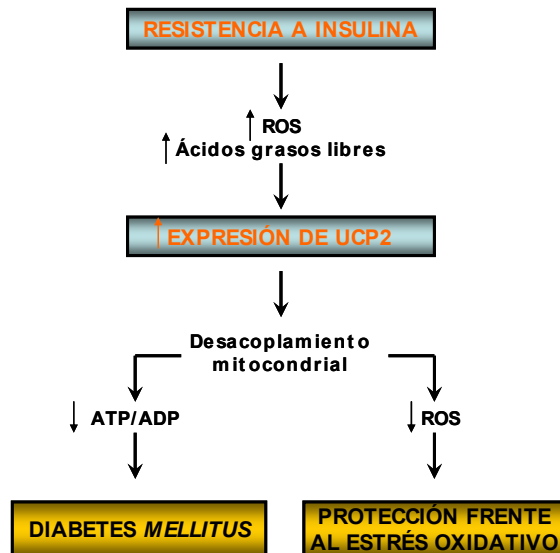


Fig. I15. Efecto “yin yan” de la UCP2 en la célula β . La resistencia a la insulina consiste en la incapacidad de la hormona de suprimir la producción hepática de glucosa y de promover su captación por los tejidos periféricos. Esto provoca un estado de hiperglicemia y de hiperlipidemia unido a estrés oxidativo. La UCP2 se induce en respuesta al aumento de ROS para prevenir el riesgo de daño oxidativo, pero al mismo tiempo, disminuye la secreción de insulina favoreciendo el desarrollo de la diabetes mellitus.

3.2.4 UCP2 en la obesidad

El balance energético es un estado metabólico donde el gasto energético está equilibrado con la energía introducida con la dieta. Cuando la energía derivada de la alimentación es mayor de la gastada, el exceso se acumula en forma de grasa y provoca un aumento de peso, que puede derivar a importantes alteraciones metabólicas como la obesidad. La desregulación del metabolismo de los lípidos es, por tanto, un factor clave en la aparición de esta patología (McGarry 2002). Estos datos están confirmados por diversos trabajos donde se observó que la acumulación de lípidos en miocitos y hepatocitos está fuertemente correlacionada con la resistencia a insulina en individuos diabéticos y obesos (Boden and Shulman 2002).

No hay que olvidar que la acumulación de estos ácidos grasos libres promueve la síntesis de ceramida que desencadena un proceso irreversible de lipoapoptosis. A nivel mitocondrial, el exceso de ácidos grasos causa una mayor producción de ROS, un cambio en la permeabilidad a protones y formación de PTPm (Fig. I16) (Yamagishi, Okamoto et al. 2002).

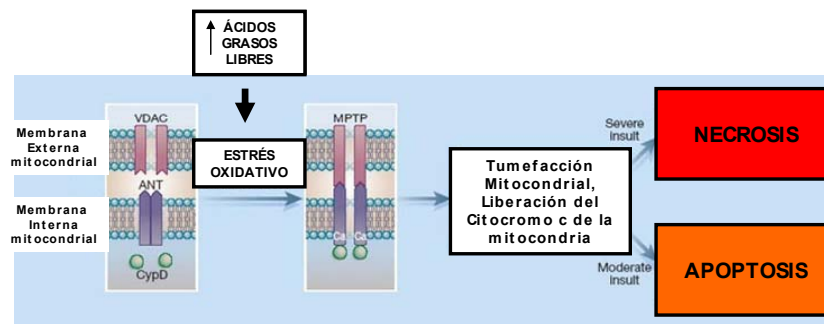


Fig. I16. Formación del PTP en la mitocondria. La porina (VDAC) presente en la membrana externa y la ANT en la membrana interna forman el PTP en situación de estrés oxidativo. La apertura del poro

causa la activación de las vías apoptóticas o incluso puede llevar a la necrosis directa de la célula en condiciones de estrés oxidativo severo. Imagen adaptada de Halestrap et al., [2005].

Por tanto, al igual que lo que ocurre en el caso de la secreción de insulina, se ha propuesto que en la UCP2 se induce en estos casos en respuesta al incremento de la formación de ROS para evitar la lipotoxicidad que ocasiona la acumulación de los ácidos grasos en la matriz. Al mismo tiempo el ligero desacoplamiento producido por la inducción de la UCP2 tiene como efecto indirecto facilitar la oxidación de los ácidos grasos (Echtay, Roussel et al. 2002)

Recientemente se ha centrado la atención sobre algunas mutaciones genéticas relacionadas con el gen de la UCP2, que parecen estar vinculadas con desordenes metabólicos. Se ha visto como el polimorfismo 866 A/G, presente en el promotor del gen de UCP2, aumenta la transcripción del gen y disminuye los riesgos de padecer desordenes metabólicos (Esterbauer, Schneitler et al. 2001; Krempler, Esterbauer et al. 2002; Shen, Qi et al. 2006). De la misma manera se ha observado que una mutación en el aminoácido 55 del exón 4 del gen de la UCP2 parece implicada en el desarrollo precoz de la obesidad (Wang, Huang et al. 2007). Esta mutación consiste en la substitución de una alanina por una valina (Ala55Val). Otros autores también han determinado que pacientes adultos con el genotipo Alanina/Alanina (Ala/Ala) del gen de UCP2 con la mutación Ala55Val, presentan una mayor predisposición en desarrollar obesidad, con respecto a Alanina/Valina (Ala/Val) o Valina/Valina (Val/Val) (Chen, Lee et al. 2007; Kosuge, Soma et al. 2008). Hay que decir también que otros autores han descartado esta implicación del gen de la UCP2 con la obesidad (Berentzen, Dalgaard et al. 2005; Guo, Liu et al. 2005).

Está descrito que la obesidad se considera como una inflamación crónica y el TAB es el principal sitio responsable del estado inflamatorio, incrementando la secreción de múltiples factores pro-inflamatorios además de aumentar su masa en el organismo (Festa, D'Agostino et al. 2001; Hotamisligil 2003; Trayhurn 2005). Se ha visto que en los pacientes obesos hay una infiltración de macrófagos en el TAB, provocando una considerable amplificación del estado inflamatorio en el tejido (Weisberg, McCann et al. 2003). Si en el pasado se focalizaba la fisiología de este tejido en la lipogénesis y la

lipólisis y la regulación de estas dos vías metabólicas, ahora se ha puesto de manifiesto que se trata del mayor órgano endocrino con función secretoria existente. Esto le confiere un papel clave en el estudio de los desordenes metabólicos que provocan estados patológicos como la obesidad (Arner 2000). Por tanto, existe un consenso generalizado en afirmar que para investigar y comprender más a fondo el papel de la UCP2 en esta enfermedad, es importante esclarecer la función fisiológica que ejerce la UCP2 en el tejido adiposo blanco (TAB).

PARTE 4

UCP2 Y EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

4.1 EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

En el pasado el tejido adiposo blanco se ha considerado tradicionalmente como un sitio de almacenamiento de reservas de grasas que tenía como función la de proporcionar el “combustible” a otros tejidos. Sin embargo, hoy es evidente que tiene funciones fisiológicas importantes, secretando numerosas hormonas, las cuales participan tanto en la regulación autocrina y paracrina dentro del propio tejido, como en la regulación endocrina de órganos distantes tales como músculo, hígado, páncreas y cerebro (Trayhurn and Wood 2004; Ronti, Lupattelli et al. 2006). El TAB está formado principalmente por adipocitos blancos. Su morfología es redondeada con una gota lipídica que ocupa el 95% del peso celular, desplazando al resto de los orgánulos hacia la periferia. El tamaño del adipocito puede oscilar entre 25-200 μm de diámetro, dependiendo del almacenamiento de triglicéridos en el interior de la gota. El TAB se compone también por otros tipos celulares como células endoteliales, monocitos, macrófagos, preadipocitos y otros más, cuyo papel es muy importantes tanto en procesos fisiológicos como en estados patológicos (Prunet-Marcassus, Cousin et al. 2006). En condiciones fisiológicas el 80% de los adipocitos se localizan en tejido subcutáneo, mientras que el 20% en el tejido adiposo visceral. El TAB es un tejido que presenta marcadas diferencias en la actividad metabólica en función de su localización anatómica, por este motivo se ha observado que el tejido subcutáneo es más sensible a los efectos de la insulina sobre el metabolismo y la función endocrina, mientras que el tejido visceral presenta una mayor inervación simpática con un gran número de receptores β_3 -adrenérgicos, lo que le facilita una mayor actividad endocrina en respuesta a las catecolaminas y glucocorticoides (Giorgino, Laviola et al. 2005).

4.1.1 Aspectos metabólicos del tejido adiposo blanco

Los niveles de lípidos presentes en el adipocito blanco son el resultado de múltiples procesos, que incluyen la hidrólisis de triglicéridos, síntesis de ácidos grasos, captación de los ácidos grasos en el interior de la célula y su esterificación (Trujillo and Scherer 2006). El mantenimiento del equilibrio lipídico entre el depósito y movilización de triglicéridos está regulado principalmente por la insulina y las catecolaminas, dependiendo de las necesidades del organismo. Normalmente, después de una ingesta, hay un aumento de la secreción de insulina para que la glucosa sea introducida correctamente en el adipocito y degradada durante la glicólisis. Este proceso favorece la formación y almacenamiento de triglicéridos, que es llevado a cabo por las enzimas ACC y FAS. Además, la insulina inhibe la lipólisis mediante un mecanismo que implica la acción de la enzima fosfodiesterasa (PDE)-3B, que provoca una menor activación de la proteína quinasa A (PKA), de la lipasa sensible a hormonas (HSL) y, por lo tanto, una menor hidrólisis de triglicéridos (Giorgino, Laviola et al. 2005).

Por el contrario, la concentración de catecolaminas aumenta en situaciones de déficit energético. Como se ha comentado en el apartado 2.1 de la Introducción, la interacción de las catecolaminas con los receptores β 3-adrenérgicos inicia una serie de reacciones enzimáticas que llevan a la activación de la HSL y, por tanto, al aumento de la hidrólisis de los triglicéridos (Giorgino, Laviola et al. 2005). La lipólisis en el TAB moviliza los ácidos grasos que normalmente no son oxidados en este tejido, debido principalmente a que el adipocito blanco presenta un número de mitocondrias sensiblemente inferior que otros tejidos como músculo o TAP. Además, presenta una pequeña capacidad oxidativa que deriva de la baja actividad de la enzima carnitinpalmítoil transferasa-1 (CPT-1) (Trujillo and Scherer 2006). Por tanto, los ácidos grasos o se exportan en la sangre para ser oxidados durante la β oxidación en otros tejidos periféricos como hígado o músculo esquelético o se reesterifican. Se ha puesto de manifiesto que la caveolina-1, proteína de membrana plasmática que se expresa abundantemente en el adipocito, podría tener un papel relevante en la movilización de los lípidos (Lisanti, Scherer et al. 1994). En este sentido se ha observado que ratones deficientes para el gen de la caveolina-1 no muestran un aumento de los niveles de ácidos grasos libres en el plasma ni tampoco un aumento de la lipólisis en respuesta a la estimulación de los receptores β 3-adrenérgicos (Cohen, Hnasko et al. 2004).

Además de la insulina, también los receptores PPAR γ tienen una función importante en la adipogénesis. Este proceso consta de dos fases: una más temprana donde tiene lugar un aumento en los niveles de triglicéridos en el adipocito (hipertrofia), mientras que la segunda fase consiste en un aumento del número de adipocito (hiperplasia) que se

realiza a partir de la diferenciación de las células preadipocítica a adipocitos. Los estudios llevados a cabo en la línea adipocitaria 3T3-L1, considerada el modelo predominante de estudio de la adipogénesis *in vitro*, han permitido aclarar diversos aspectos de este proceso. En este sentido se ha descrito una vía de señalización clave en la hipertrofia del TAB, que consiste en la fosforilación del factor de transcripción CEPB β por parte de la MAP quinasa (MAPK) p38, que induce la expresión de los PPAR γ . Dicha inducción es la que promueve la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos blancos (Engelman, Lisanti et al. 1998). La importancia de los PPAR γ se refleja también en el hecho de que representan la diana principal de una clase de fármacos antidiabéticos conocido como tiazolinediona (TDZ). Son agonistas de los PPAR γ y provocan un cambio en el patrón de expresión génica del adipocito que determina un aumento de la lipogénesis y la movilización de los triglicéridos desde las células no adipocíticas hacia los adipocitos (Boden and Zhang 2006). Esto mejora el perfil lipídico del organismo y evita que se acumulen ácidos grasos en el hígado, que sería perjudicial para su correcto funcionamiento.

Debido a que el metabolismo del adipocito blanco parece estar estrechamente vinculado con los niveles de ATP en la célula, se deduce que la quinasa dependiente de AMP (AMPK) tenga un papel relevante en la fisiología del TAB (Rossmeisl, Flachs et al. 2004). Se trata de un regulador clave del estado energético celular, que induce una cascada de eventos en las células en respuesta a los constantes cambios de energía (Kahn, Alquier et al. 2005; Misra 2008).

4.1.2 La AMPK: regulador clave del balance energético

Como su nombre lo indica, la AMPK se activa por el AMP (Hardie, Hawley et al. 2006). De aquí se deduce que aumentos de los niveles de AMP celular o, que es lo mismo, una disminución del ATP conlleva a un aumento de la actividad de la AMPK. Las causas que provocan un cambio en los niveles de ATP pueden ser fisiológicas (ejercicio físico o contracción muscular) o patológicas (isquemia, privación de glucosa, intoxicación metabólica...). En todos los casos, una vez activada la AMPK estimula las vías metabólicas que producen ATP como la oxidación de los ácidos grasos o de la glucosa, mientras que inhibe aquellas vías que gastan ATP como la síntesis de los ácidos grasos y del colesterol (Fig. I17).

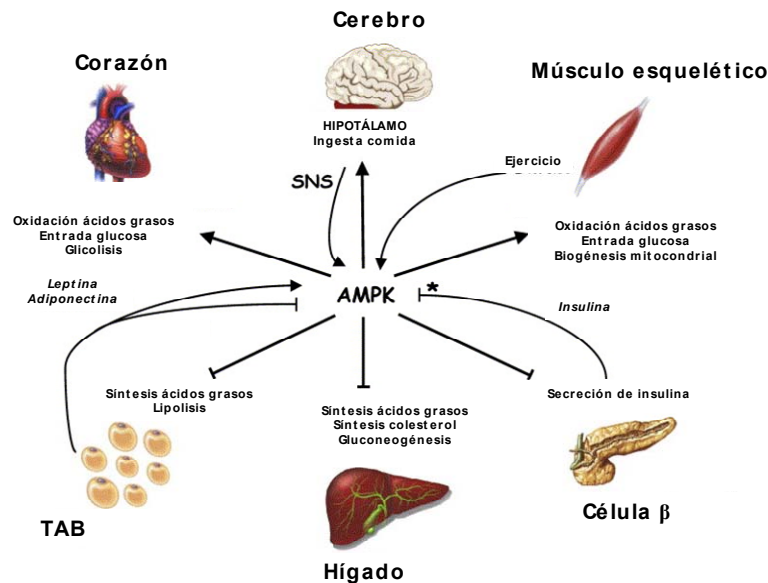


Fig. I17. Esquema de la regulación de la homeostasis energética por la AMPK. En este esquema se muestra como la AMPK promueve la activación de las vías catabólicas, mientras inhibe las vías anabólicas en distintos tejidos y órganos. Imagen adaptada de Hardie et al., [2005].

Se han descrito también mecanismos de activación de la AMPK que no dependen del balance energético. En este sentido, se conoce la existencia de quinasas alternativas que activan a la AMPK independientemente de los niveles de AMP intracelulares. Una es la quinasa- β quinasa dependiente de Ca^{2+} calmodulina (CAMKK β), que fosforila y activa a la AMPK en respuesta a concentraciones altas de calcio (Hawley, Pan et al. 2005; Woods, Dickerson et al. 2005). Además se ha puesto de manifiesto que también las ROS podrían ser unas importantes activadoras de la AMPK. En este sentido, cabe destacar el trabajo de dos grupos que observaron que el peroxinitrito aumenta los niveles de AMPK fosforilado sin que se detecten cambios en el ratio ATP/ADP (Zou, Kirkpatrick et al. 2004; An, Wang et al. 2007)

Esta enzima fue descrita por primera vez en 1973 como una proteína inducida por la AMP, que inhibe la actividad de los enzimas 3-hidroxi-3-metilglutaril CoA reductasa (HMGCoA reductasa) y acetil-CoA carboxilasa (ACC) (Beg, Allmann et al. 1973). Actualmente se sabe que la AMPK es una enzima trimérica compuesta de una subunidad- α catalítica, y de las subunidades no catalíticas β y γ (Lihn, Jessen et al. 2004). Existen dos isoformas de la subunidad- α , (α -1 y α -2) que, a pesar de tener una alta homología entre ellas, presentan ciertas diferencias funcionales. Por ejemplo se ha observado que la α -2 es la que se induce en condiciones de hipoxia (Li, Zeng et al. 2007), mientras que la subunidad α -1 (que se expresa mayoritariamente en el TAB) estimula el metabolismo lipídico en el adipocito blanco (Daval, Diot-Dupuy et al. 2005). Esta quinasa se activa por AMP según tres mecanismos independientes: 1) por interacción alosterica de enzimas fosforilados, 2) por fosforilación del dominio catalítico treonina 172 (Tre 172) presente en la subunidad α , 3) por inhibición de la defosforilación de la Tre 172 por fosfatasas (Hardie, Hawley et al. 2006). Este triple mecanismo resalta

la eficiencia del sistema regulador del balance energético mediado por la AMPK. La fosforilación de la AMPK depende, a su vez, de la acción de una o más AMPK quinasas (AMPKKs). Se ha demostrado que las que tienen más afinidad son la quinasa de treonina (LKB1) y la CAMKKb (Woods, Johnstone et al. 2003; Daval, Foufelle et al. 2006).

Como se refleja en la figura I18, la principal función de la AMPK en el TAB es:

- Inhibir la síntesis de ácidos grasos. La AMPK ejerce un doble efecto sobre las enzimas lipogénicas ACC y FAS: por un lado disminuye la actividad de ambas, y por otro inhibe la expresión de SREBP-1, provocando la inhibición de la expresión de la ACC y la FAS. Esto provoca también la disminución de los niveles del enzima glicerol-acil transferasa, clave en la síntesis de los triglicéridos (Park, Kaushik et al. 2002; Orci, Cook et al. 2004).

- Promover la β -oxidación. El malonil-CoA mantiene un control negativo sobre la actividad de la CPT-1. Este enzima es responsable de introducir los ácidos grasos dentro la mitocondria durante la β -oxidación. Por tanto la inhibición de la síntesis del malonil-CoA por la AMPK incrementa la expresión de la CPT-1, que debería promover un aumento de la oxidación de los ácidos grasos (Hardie, Hawley et al. 2006). Sin embargo, el adipocito se caracteriza por poseer muy pocas mitocondrias, además la CPT-1 en este tejido presenta una baja actividad, así que los ácidos grasos son exportados hacia otros tejidos para ser oxidados. A pesar de la baja capacidad oxidativa del adipocito blanco, cabe destacar que la AMPK promueve una biogénesis mitocondrial que puede llevar a un aumento de la β oxidación *in situ*.

- Regular la lipólisis. Existen datos contradictorios en este caso. Por un lado, se ha demostrado que la activación de la AMPK promueve la hidrólisis de los triglicéridos en el adipocito (Yin, Mu et al. 2003). Por otro lado, se ha descrito que la AMPK parece ejercer un efecto antilipolítico en el TAB, puesto que promueve la fosforilación de HSL (lipasa sensible a hormonas) y ATGL (lipasa de triglicéridos), disminuyendo su actividad lipolitica (Daval, Foufelle et al. 2006).

- Aumentar la captación de glucosa. Se ha descrito que la activación de la AMPK mejora la sensibilidad a la insulina, aumentando la captación de la glucosa por las células y su utilización. Recientemente se ha mostrado que, en la línea adipocitaria 3T3-L1, la activación de la AMPK favorece la translocación del receptor GLUT4 en la membrana plasmática y, por lo tanto, aumenta el transporte de la glucosa hacia el interior de la célula (Yamaguchi, Katahira et al. 2005).

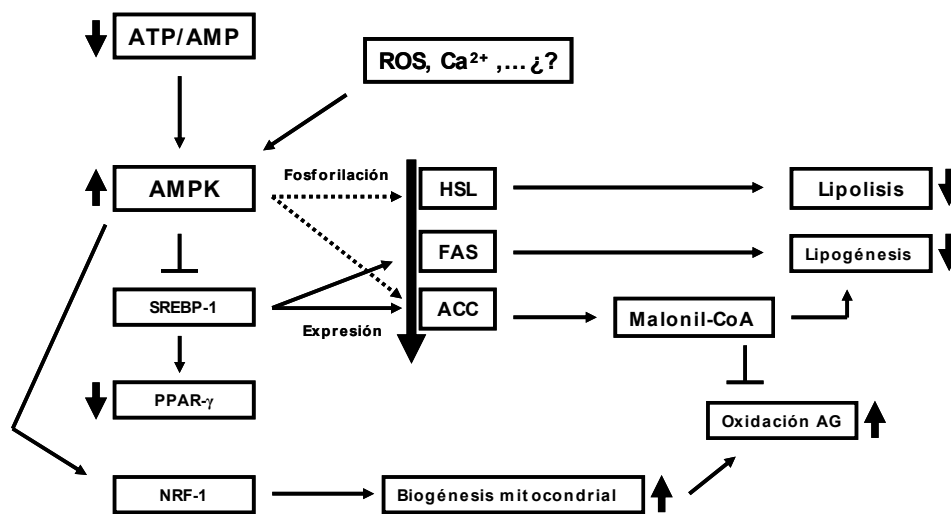


Fig. I18. Esquema de la activación de la AMPK y sus efectos en el TAB. La activación de la AMPK comporta una disminución de la lipólisis y lipogénesis a través de la inactivación de las principales enzimas implicadas en el metabolismo lipídico (FAS, ACC y HSL) y la disminución de la expresión de los genes lipogénicos posiblemente a través de la inhibición de la expresión de SREBP-1 y PPAR γ . Sin embargo, la inducción del factor de transcripción NRF-1 que promueve la biogénesis mitocondrial, podría estimular la oxidación de los ácidos grasos en el adipocito. Imagen adaptada de Rossmeisl et al., [2004].

Se ha descrito que la AMPK es responsable en parte de la acción de dos importantes adipoquinas como la adiponectina y la leptina (Misra 2008). La leptina es una hormona clave en la regulación del balance energético, porque, presuntamente a través de la activación de la AMPK, promueve el catabolismo lipídico en músculo, garantizando un rápido incremento del ATP celular (Minokoshi, Kim et al. 2002; Orci, Cook et al. 2004). Unger y colaboradores han observado que en el TAB la leptina aumenta los niveles de AMPK *in vivo*, y que es necesario inactivar la acción paracrina de la leptina para permitir la acumulación de triglicéridos (Wang, Orci et al. 2005). En el caso de la adiponectina, se vio que esta quinasa no sólo favorece el transporte de la glucosa en la célula muscular (Kahn, Alquier et al. 2005), sino también en el adipocito (Lihn, Jessen et al. 2004). Estudios efectuados en adipocitos tratados con un activador de la AMPK (AICAR) revelan que la captación de glucosa aumenta y es independiente de la señal de la insulina (Salt, Connell et al. 2000).

4.1.3 Función endocrina del tejido adiposo blanco: las adipoquinas

Las hormonas secretadas en el TAB se han denominado “adipoquinas” y como muestra la figura I20 se hallan implicadas en:

- La regulación del peso corporal (leptina, adiponectina)
- La función del sistema inmune (TNF- α , IL-1, IL-6)

- La función vascular (angiotensina e inhibidor del activador del plasminógeno tipo I)
- Desarrollo de la resistencia a la insulina (resistina)

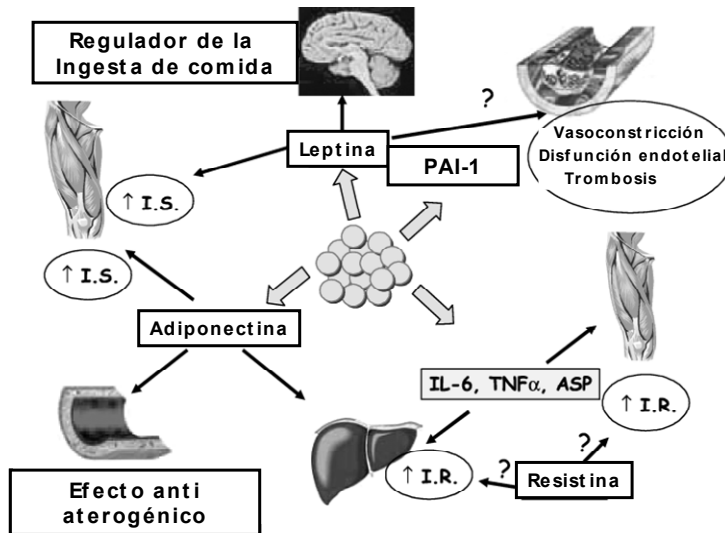


Fig. 120. Esquema de la función endocrina del TAB. Las adipoquinas secretadas principalmente por el TAB están implicadas en distintos procesos fisiológicos, principalmente en la sensibilidad a la insulina (IS) y balance energético. Una disfunción en la síntesis y secreción de estas adipoquinas provoca resistencia a insulina (IR) y alteración de la pared vascular que pueden causar síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares. Imagen adaptada de Ronti et al., [2006].

Leptina: Es una hormona de 146 aminoácidos que es producida principalmente, pero no exclusivamente por el TAB, puesto que se ha descrito que el estómago, los huesos, la placenta y el epitelio mamario también sintetizan esta hormona (Rayner and Trayhurn 2001). Su secreción está estimulada por glucocorticoides, insulina, interleuquina-1 y TNF- α , mientras que la que atenúan su expresión son la testosterona y hormonas tiroideas. Este péptido tiene un papel clave en el control del apetito y en el balance energético, debido a que en el hipotálamo activa receptores que estimulan la síntesis de péptidos anorexigénicos como la proopiomelanocortina e inhibe la síntesis de péptidos orexigénicos como el neuropéptido Y (Ahima, Saper et al. 2000). En el tejido adiposo la leptina juega un papel primordial en la regulación del metabolismo lipídico, puesto que su acción (a través de la AMPK) hace disminuir las reservas de triglicéridos promoviendo de modo concertado una inhibición de la esterificación y un aumento de la oxidación de ácidos grasos, además de proteger de la lipotoxicidad (Unger 2000). De hecho, un aumento en el número y/o tamaño de los adipocitos lleva a un aumento en la secreción de leptina con dos efectos fundamentales: una disminución del apetito y un aumento del gasto energético. De acuerdo con su función, se ha demostrado que pacientes que padecen lipodistrofia con una concentración de leptina en la sangre muy por debajo de los valores fisiológico, redujeron sensiblemente sus niveles de triglicéridos después de ser tratados con 2 dosis diaria de leptina a concentraciones fisiológicas (Wolfsdorf, Sadeghi-Nejad et al. 2002).

En general, se puede decir que la leptina actúa como una citoquina multifuncional, ya que es una señal importante en distintos órganos y tejidos. En el hígado estimula la oxidación de los ácidos grasos y disminuye la lipogénesis; en el páncreas inhibe la secreción de insulina; aumenta la actividad fagocítica de los macrófagos y también la producción de citoquinas proinflamatorias; promueve la angiogénesis al estimular la proliferación de las células endoteliales (Ronti, Lupattelli et al. 2006).

Adiponectina: Es una proteína de 300 aminoácidos que se expresa en el TAB de forma específica y muy abundante (Scherer, Williams et al. 1995), donde su acción promueve la diferenciación de las células preadipocíticas a adipocitos probablemente a través de los receptores PPAR γ . Como en el caso de la leptina, su principal función es participar en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos, donde su expresión coincide con un aumento de la sensibilidad a la insulina y una mejoría del perfil lipídico (Trujillo and Scherer 2005). La adiponectina actúa en varios tejidos y órganos, puesto que sus dos receptores (adipo-R1 y adipo-R2) se encuentran ampliamente distribuidos en el organismo. En el hígado disminuye la expresión de genes implicados en la gluconeogénesis, regula la actividad de los enzimas fosfoenol-piruvato-carboxiquinasa y glucosa-6 fosfatasa, que son claves para la gluconeogénesis, y, además, inhibe la liberación de la glucosa (Berg, Combs et al. 2001). De este modo produce el descenso de los niveles glucémicos. En el corazón se ha mostrado que tiene importantes propiedades cardioprotectoras, disminuyendo el tamaño del infarto en modelos de isquemia-reperfusión. En el cerebro activa vías de señalización que promueven una disminución del peso corporal y del contenido adiposo. En el músculo esquelético, a través de la estimulación de los receptores GLUT-4 e IRS-1 aumenta la captación de la glucosa y la sensibilidad a la insulina respectivamente (Yamauchi, Kamon et al. 2001). Además, favorece la β -oxidación fosforilando el enzima acetil-CoA carboxilasa.

Al contrario que la mayoría de las adipoquinas, sus niveles se reducen notablemente en la obesidad (Arita, Kihara et al. 1999; Hotta, Funahashi et al. 2000), lo que provoca un aumento del riesgo cardiovascular, resistencia a la insulina y diabetes. Esto puede ser debido a que en esta patología aumentan los niveles de la interleuquina-6 (IL-6) y del TNF- α , que son potentes inhibidores de la síntesis y secreción de esta hormona (Trujillo and Scherer 2005).

Resistina: Es una proteína de 114 aminoácidos y se sintetiza en el TAB. Su secreción está estrechamente controlada por condiciones nutricionales y hormonales. Se encuentran bajas concentraciones en ayuno y su nivel aumenta con la ingesta. Tiene una acción antagónica a la adiponectina, debido a que reduce el transporte de glucosa dependiente de insulina en el músculo y tejido adiposo blanco, aumenta la producción

hepática de glucosa y la glucemia en ayunas e inhibe la adipogénesis (Ukkola 2002). Además, se ha observado que los TDZ (que aumentan la sensibilidad a la insulina) disminuyen sensiblemente la síntesis de esta hormona *in vitro* (Steppan, Bailey et al. 2001). Por este motivo se ha vinculado esta hormona con el aumento de la resistencia a la insulina y el desarrollo de la obesidad.

En humanos la función fisiológica de la resistina es todavía tema de debate, no obstante se ha postulado que esté involucrada en la respuesta inflamatoria, debido a que esta hormona es producida principalmente en los monocitos y está relacionada con los niveles de IL-6 (Steppan and Lazar 2004).

Adipsina: Se trata de una proteasa rica en serinas, que es sintetizada por el TAB. Se considera importante en la fase inicial de la vía alternativa del complemento. A pesar de que su acción conlleva un aumento del acumulo de triglicéridos en el TAB, una disminución de la lipólisis y una reesterificación de los ácidos grasos (Van Harmelen, Reynisdottir et al. 1999), el receptor y las vías de señalización inducida por esta adipoquina no se conocen. Se encuentra elevada en la obesidad con un sistema regulatorio dependiente del incremento de la insulina y los glucocorticoides, aunque no se ha establecido su papel en este estado patológico.

Proteína estimuladora de la acilación (ASP): Es una proteína del complemento que deriva de la interacción entre la adipsina, el complemento 3 y el factor B. Su función es la captación y esterificación de los ácidos grasos hidrolizados de los triglicéridos por la lipoproteína lipasa 1 (LPL-1). En pacientes obesos la ASP está disminuida, lo que lleva a un aumento de los ácidos grasos libres desde el TAB hacia principalmente el hígado. Curiosamente, se ha observado que los pacientes que presentan disfunciones arteriales tienen una elevada concentración de ASP (Cianflone, Zhang et al. 1997).

Interleuquina-1 e Interleuquina-6: Las interleuquinas (ILs) son péptidos señalizadores, mediadores químicos, que se producen en respuesta a la infección de un tejido por agentes patógenos y causan respuesta inflamatoria. IL-1 es secretada no sólo por el adipocito, sino también por linfocitos, macrófagos y células endoteliales, mientras que la IL-6 es una citoquina proinflamatoria multifuncional y es sintetizada en numerosos tipos celulares como las células endoteliales, las musculares, los adipocitos y otros más. Ambas son importantes factores que contribuyen a la inflamación del TAB. Este proceso es un estadio inicial al desarrollo de alteraciones metabólicas como la resistencia a la insulina (Meier and Thalmann 2007). En general, median la respuesta inflamatoria activando los monocitos y la expresión de moléculas de adhesión. Por tanto, como cabe

esperar, una disfunción en la secreción de estas adipocinas comporta una deficiencia en la respuesta inmune de macrófagos y neutrófilos (Kopf, Baumann et al. 1994).

TNF- α : Es una proteína soluble de 17 kDa, producida principalmente en monocitos, linfocitos y TAB. Su principal acción es regular la síntesis de algunas proteínas de la fase aguda y estimular la producción de prostaglandina. Los primeros estudios mostraron que su inhibición coincidía con una mejoría de la resistencia a la insulina en ratas obesas, por lo que se vinculó con el desarrollo de esta enfermedad. De manera análoga se ha observado que la inhibición de la acción de la insulina causada por el TNF α es contrarrestada por el efecto antagónico de los TDZ, respaldando la teoría de su posible papel en la resistencia a la insulina (Boyle 2004).

Una reciente hipótesis sugiere que la producción del TNF α en ratas obesas provoca la inhibición de la síntesis del óxido nítrico estimulada por la insulina, que conlleva a una pérdida del tono arterial (Yudkin, Eringa et al. 2005). Estos datos explicarían la relación entre la resistencia a la insulina y las disfunciones arteriales.

Inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1): Es una proteína que se sintetiza principalmente en el hígado y en el TAB. Su principal función es la de inhibir la fibrinólisis. El compartimiento más importante de PAI-1 son las plaquetas y se libera por acción del colágeno y ADP. Es una citoquina clave en la homeostasis vascular (Skurk and Hauner 2004). Su síntesis es regulada por numerosas sustancias como interleucina-1, endotoxina, TNF- α y la insulina a nivel hepático. Se ha observado que sus niveles aumentan proporcionalmente a la adiposidad visceral, mientras que disminuyen en condiciones de restricción calórica, pérdida de peso y en el tratamiento con metformina (Alessi, Peiretti et al. 1997).

4.2 UCP2 EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

Se ha descrito que una disminución de la eficiencia energética provoca un aumento de la actividad de AMPK que a su vez consigue reducir el acumulo de las reservas de grasa en el organismo (Kopecky, Rossmeisl et al. 2004). En este sentido cabe destacar el trabajo de Kopecky y su grupo que utilizaron un modelo de ratones transgénico P2-UCP1 para estudiar los efectos del estado energético celular en el almacenamiento de triglicéridos *in vivo* (Kopecky, Clarke et al. 1995). En este caso el P2, que es un promotor específico del TAB, promovía la expresión ectópica de la UCP1. Este grupo observó que estos ratones transgénicos presentaban una resistencia a desarrollar obesidad inducida experimentalmente, que se reflejaba con un menor acumulo de grasa en el TAB. Ellos explicaron que este efecto era debido a que la actividad desacoplante de la UCP1 provocaba una reducción de la eficiencia energética con consiguiente activación de la

AMPK en el adipocito. Esto, a su vez, provocaba la disminución de las enzimas lipogénicas, además de inhibir la expresión de los PPAR γ .

A raíz de los trabajos de Kopecy y después de confirmarse que la UCP2 se expresaba en el tejido adiposo blanco, se postuló que la UCP2 en este tejido podría ejercer una acción directa sobre el metabolismo de los lípidos. (Samec, Seydoux et al. 1998; Jaburek, Varecha et al. 1999; Samec, Seydoux et al. 1999). En este sentido, el trabajo del grupo de Unger puso de manifiesto que la UCP2 podría estar involucrada en la acción de algunas hormonas importantes para el metabolismo energético como en el caso de la leptina (Fig. I21). Como explicado anteriormente, esta hormona tiene un control sobre el peso corporal aumentando el gasto energético y reduciendo el estímulo del apetito. Así, se ha demostrado que la leptina hace disminuir los niveles de mRNA de dos enzimas lipogénicas como la acetil-CoA carboxilasa (ACC) y de la ácido graso sintasa (FAS) mientras que aumenta los niveles de mRNA de enzimas lipolíticos como la acil-CoA oxidasa (ACO), la carnitina palmitoil transferasa-1 (CPT-1), la citrato sintasa y curiosamente también de la UCP2 (Zhou, Shimabukuro et al. 1997; Ceddia, William et al. 2000).

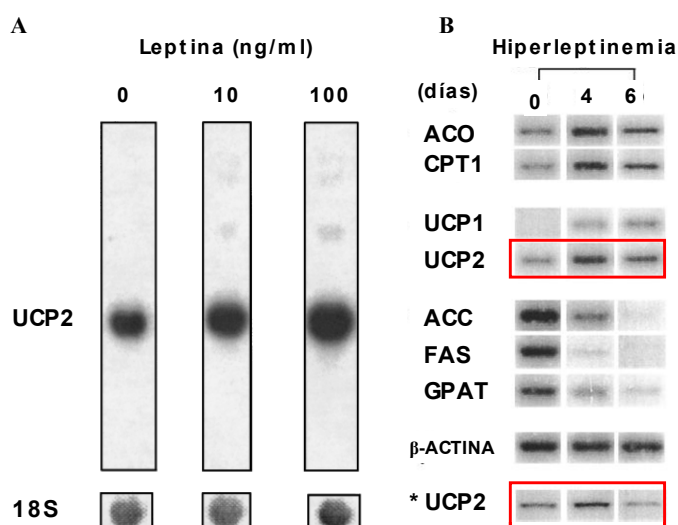


Fig. I21. La leptina aumenta la expresión de UCP2 en el adipocito blanco. (A) En adipocitos blancos aislados del tejido adiposo blanco epididimal de rata, altas dosis de leptina (100 ng/ml) inducen la expresión de UCP2. Imagen extraída de Ceddia et al., [2000]. (B) En adipocitos blancos aislados del tejido adiposo blanco epididimal de rata altas dosis de leptina estimulan el metabolismo lipídico y aumenta la expresión de UCP2. Imagen extraída de Unger et al., [1999].

Unger y colaboradores propusieron un nuevo modelo de lipólisis inducida por leptina donde esta hormona no sólo promueve una disminución de las reservas de triglicéridos en el adipocito, sino que los ácidos grasos van a ser oxidados en el interior del mismo adipocito (Wang, Lee et al. 1999). La UCP2 podría jugar un doble papel en este proceso. Por una parte podría facilitar la oxidación de las grasas sin que esta oxidación esté acoplada a otros procesos que requieran de esta energía pero, además, podría estar minimizando el daño oxidativo que se produce en condiciones en las que los niveles de lípidos son elevados y/o están siendo oxidados.

Otro grupo ha mostrado que la UCP2 podría estar involucrada en la acción de otra hormona sintetizada en el adipocito blanco: la adiponectina (Lihn, Ostergard et al. 2003; Pedersen, Nyholm et al. 2005). Esta hormona contribuye a aumentar la entrada de la glucosa en la célula, permitiendo una correcta homeostasis glucosa/insulina. Se ha visto que los ratones UCP2^{-/-} presentan menores niveles de expresión de adiponectina y menor niveles circulantes en la sangre, mientras que la sobreexpresión de UCP2 en la línea celular adipocitaria 3T3-L1 aumentaba la transcripción del gen de la adiponectina.

Es importante señalar que estos autores han propuesto que el mecanismo por el cual la UCP2 controle la expresión de la adiponectina en este tejido dependa de los niveles de ROS en la célula (Chevillotte, Giralt et al. 2007). Las ROS están involucradas en la acción del factor de transcripción CHOP-10, que es un inhibidor de la transcripción del gen de la adiponectina. En los ratones UCP2^{-/-} los niveles de CHOP-10 son más altos que en los ratones control. Por tanto, la UCP2 disminuyendo los niveles de ROS, inhibe la acción de CHOP-10. Esta inhibición es la que permite que aumente la expresión de la adiponectina. Como se puede apreciar, también en este caso emerge la idea de que a la base de los efectos descritos para la UCP2 esté un mecanismo de acción común en todos los casos que es el de regular la formación de ROS en la célula.

En concordancia con este aspecto, un reciente trabajo ha evidenciado que la UCP2, regulada por las ROS, podría estar implicada en el mecanismo de entrada de la glucosa inducido por la insulina en el adipocito blanco (Zhou, Zhao et al. 2009). De este estudio emergió que la inhibición de la UCP2 por genipina producía un aumento de las ROS, del potencial de membrana, del ATP celular y curiosamente una disminución de la eficacia del proceso de entrada de la glucosa inducido por la insulina. Se observó además que se producía una fosforilación de las quinasas JNK 1 y 2, que inducía a su vez una fosforilación del substrato-1 del receptor de insulina (IRS-1). Del análisis de estos datos se concluyó que el aumento de ROS era responsable del inicio de la señalización de las quinasas, que tenía como consecuencia la inhibición por fosforilación de IRS-1 y por tanto un empeoramiento de la entrada de la glucosa inducida por la insulina. Por tanto, UCP2 a través del control sobre los niveles de ROS, favorece una correcta homeostasis glucosa/insulina.

4.3 LA METFORMINA

La metformina pertenece a la clase de fármacos conocidos con el nombre de biguanidas. Estos medicamentos se utilizaban ya durante el siglo pasado como agentes terapéuticos para la diabetes *mellitus*. Hoy día se conocen sus importantes ventajas farmacológicas

como no ligarse a las proteínas, no requerir ser metabolizado por el hígado, tener una vida media corta y eliminarse por vía renal (DeFronzo 1999; Kirpichnikov, McFarlane et al. 2002). Además de ser eficaz en el tratamiento de la diabetes, induce también una pérdida de peso. Diversos estudios en obesos no diabéticos han demostrado que la metformina reduce el perímetro de la cintura y mejora el perfil de lípidos con disminución de la LDL-colesterol (Glueck, Fontaine et al. 2001). Su principal efecto es disminuir los niveles de glucosa en la sangre pero sin estimular la secreción de insulina, por lo que no provoca hipoglucemia (Abbasi, Carantoni et al. 1998; Wiernsperger and Bailey 1999), sino que mejora la eficacia de la insulina endógena. La fenformina fue la biguanida más utilizada hasta los años sesenta, cuando fue retirada del mercado porque causaba una elevada acidosis láctica con graves problemas gastrointestinales. Por este motivo fue introducida en el mercado la metformina como sustituto de la fenformina, porque provocaba 10 veces menos esta acidosis, hasta conseguir niveles tolerables. Actualmente es el fármaco antihiper glucémico más ampliamente utilizado en el tratamiento de la diabetes *mellitus* y sus principales diana son (Fig. I19):

- Hígado- Disminuye la producción hepática de la glucosa regulando negativamente la gluconeogénesis (Bailey and Turner 1996; Wiernsperger and Bailey 1999; Hundal, Krssak et al. 2000). En este sentido se demostró que en cultivos primarios de hepatocitos de rata se observó que la disminución de la gluconeogénesis era debido a un aumento de la piruvato quinasa, cuyo inhibidor alostérico es el ATP (Argaud, Roth et al. 1993). Como la piruvato quinasa cataliza la formación de piruvato a partir del fosfoenolpiruvato, se deduce que los cambios en el ATP intracelular llevan a una disminución de la gluconeogénesis y al aumento de rutas que producen ATP como la glicólisis. Kim y colaboradores dilucidaron con más claridad el mecanismo de acción de la metformina en el hígado, demostrando que la activación de AMPK es necesaria para un aumento en la expresión del factor de transcripción SHP, que a su vez inhibe la expresión de los genes gluconeogénicos hepáticos PECK y GLC-6-Pase (Kim, Park et al. 2008).

- Músculo- Sus efectos en este tejido son similares a la respuesta que se observa durante la contracción muscular o durante un esfuerzo físico (Towler and Hardie 2007). Es decir, aumenta la captación y utilización de la glucosa por acción directa sobre los receptores de insulina y los transportadores de membrana de glucosa GLUT (Bailey and Turner 1996; Leverve, Guigas et al. 2003), y también promueve la oxidación de los ácidos grasos. Como ejemplo se puede citar el trabajo de Ohira y colaboradores que han observado que la metformina aumenta de forma específica tanto la actividad como la expresión de la enzima lipoproteína lipasa. Puesto que esta enzima promueve el catabolismo de las lipoproteínas de baja densidad (responsables de la formación de ateromas), se ha propuesto que la

activación de la lipoproteína lipasa por la metformina podría tener efectos antiaterogénicos (Ohira, Miyashita et al. 2009).

- TAB- En trabajos recientes se ha visto que un proceso clave en la acción de la metformina en este tejido es la translocación del receptor GLUT4 en la membrana plasmática (Watson and Pessin 2006). Este proceso parece estar mediado en parte por la fosforilación de la AS60 (Akt) que depende de la activación de la AMPK (Kane, Sano et al. 2002; Baus, Heermeier et al. 2008). La metformina parece tener un importante papel inhibidor sobre la diferenciación de los adipocitos. Inhibe los PPAR γ , C/EBP α y SREBP-1, que son esenciales para la adipogénesis, además de regular negativamente los enzimas lipogénicos FAS y ACC (Habinowski and Witters 2001; Ciaraldi, Kong et al. 2002; Alexandre, Smit et al. 2008). Este efecto antagónico de la metformina sobre los PPAR γ parece tener también un efecto beneficioso en prevenir los riesgos cardiovasculares. Ensayos clínicos ha puesto de manifiesto que los TDZ, agonistas de los PPAR γ , incrementan el riesgo de infarto del miocardio, de formación de edemas e ischemia, comparados con pacientes tratados con metformina o con placebo (Aljada, Shah et al. 2009). Esta observación concuerda con otros estudios donde se ha mostrado que los tratamientos con metformina disminuyen el riesgo de complicaciones vasculares con respecto a otras drogas antidiabéticas (Bailey 2008; Selvin, Bolen et al. 2008).

- Intestino- Impide parcialmente la absorción de la glucosa a través de la pared gástrica contribuyendo así a la disminución de su concentración en la sangre (Ikeda, Iwata et al. 2000; Leverve, Guigas et al. 2003). Varios estudios *in vivo* han mostrado que la metformina se acumula en la pared intestinal en altas concentraciones, lo que explica en parte el aumento del metabolismo anaerobio, sobretodo después de la ingesta. De manera análoga estudios más recientes han observado que la metformina se acumula en la mucosa del intestino humano en mayores concentraciones que en el plasma (Bailey, Wilcock et al. 2008). Este acumulo parece ser la causa de la acidosis láctica que se detecta en los pacientes que toman este medicamento, aunque la concentraciones de lactato raramente provocan una severa acidosis láctica.

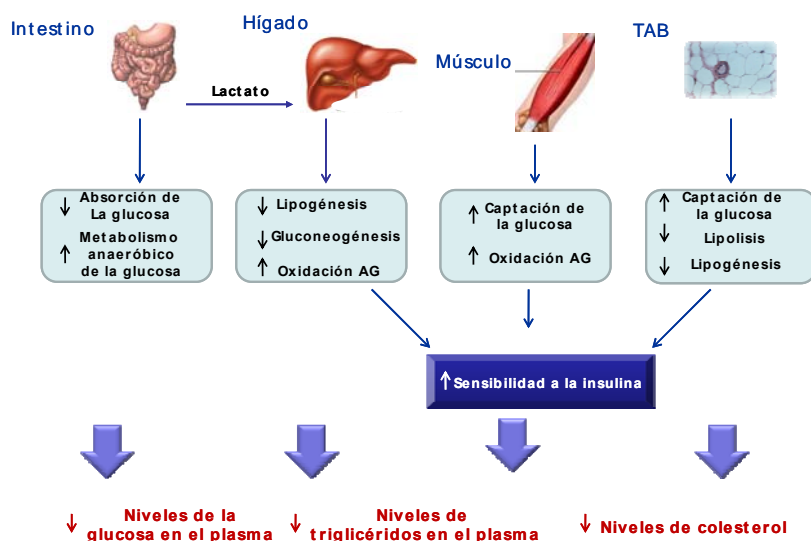


Fig. I19. Efecto de la metformina en el organismo. La metformina es un fármaco antihiper glucémico, puesto que promueve aquellas vías metabólicas que aumentan la sensibilidad a la insulina, sin estimular su secreción.

A pesar de que sea el fármaco de primera elección en diabéticos tipo II, su mecanismo de acción no se ha dilucidado aún. Lo que está cada vez más claro es que la acción de la metformina depende, por lo menos en parte, de la activación de la AMPK. Se ha propuesto que la relación molecular entre la AMPK y la metformina radique en la capacidad de este fármaco de inhibir el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial (Owen, Doran et al. 2000). Esta inhibición provoca una disminución de la síntesis de ATP, que probablemente es la señal para que la AMPK se active e induzca las vías metabólicas que se mencionaron anteriormente. Como ejemplo del nexo metabólico entre la metformina y la AMPK se puede citar la capacidad de este fármaco de aumentar la tasa glicolítica, que se refleja en la formación de lactato (Bailey, Wilcock et al. 2008). Puesto que la activación de la AMPK por metformina favorece la translocación del receptor GLUT4 en la membrana plasmática y, por lo tanto, aumenta el transporte de la glucosa hacia el interior de la célula (Yamaguchi, Katahira et al. 2005), se deduce que la glicólisis esté estimulada durante los tratamientos con metformina a través de la activación de la AMPK.

Sin embargo, la hipótesis de que la activación de la AMPK por metformina dependa de cambios en los niveles de ATP no ha podido ser plenamente confirmada por todos los estudios experimentales. En este sentido algunos grupos revelaron que la metformina activa la AMPK sin variaciones importantes en el ratio ATP:AMP (Fryer, Parbu-Patel et al. 2002; Hawley, Gadalla et al. 2002). De la misma manera Zou y colaboradores determinaron que la metformina activa la AMPK *in vivo* e *in vitro* a través del peroxinitrito (Zou, Kirkpatrick et al. 2004). La inhibición de la respiración por metformina

favorece la producción de O_2^- con consecuente formación de $ONOO^-$. Cabe señalar que el peroxinitrito no activa directamente la AMPK, sino que induce la formación de intermediarios capaces de activar LKB1, con consecuente activación de la AMPK.

Otro importante aspecto sobre el cual no hay acuerdo entre los distintos autores se centra en la implicación de la metformina en la inducción de estrés oxidativo. La hipótesis de partida se apoya en que la inhibición de la respiración causada por la metformina debería favorecer un aumento de ROS. En este sentido se ha visto que este medicamento es capaz de generar ROS y apoptosis en distintos sistemas celulares (Pavlovic, Kocic et al. 2000; Skrha, Prazny et al. 2007; Wang, Li et al. 2008). Sin embargo, existen numerosos datos bibliográficos que confieren a la metformina la capacidad de reducir los riesgos de daño oxidativo. En concordancia con este efecto se vio como en células endoteliales la metformina conseguía reducir los niveles de ROS intracelulares (Ouslimani, Peynet et al. 2005; Mahrouf, Ouslimani et al. 2006). También en otros estudios se confirmó como la metformina disminuye los niveles de anión superóxido e impide la peroxidación lipídica (Tessier, Maheux et al. 1999; Gargiulo, Caccese et al. 2002).

En conclusión, se puede afirmar que no obstante la metformina es un importante medicamento por sus efectos beneficiosos en el metabolismo, existen todavía algunas cuestiones sin resolver que son cruciales para entender a fondo los mediadores implicados en la acción de este fármaco.

OBJETIVOS

A pesar de la numerosa bibliografía sobre la UCP2, su función biológica es aún controvertida. *A priori* la UCP2, siendo una proteína desacoplante, debería tener como principal función la de disminuir la eficiencia energética de la fosforilación oxidativa. En este sentido se ha observado que en la célula β la actividad de la UCP2 provoca una menor síntesis de ATP y, por lo tanto, una menor secreción de insulina (Zhang, Parton et al. 2006). Del mismo modo, el grupo de Unger demostró que en el tejido adiposo blanco, la leptina aumenta los niveles de UCP2 cuando hay una inhibición de la lipogénesis, inducción de la lipólisis y un aumento de la β oxidación en el interior del adipocito. (Zhou, Shimabukuro et al. 1997; Ceddia, William et al. 2000). Puesto que el adipocito no utiliza la energía resultante de esta oxidación, su inducción en estas condiciones vendría a sugerir que la UCP2 podría tener una función termogénica similar a la UCP1 en el tejido adiposo pardo.

Sin embargo, en estos últimos años un número creciente de trabajos ha demostrado la implicación de la UCP2 en el control de la formación de ROS. En principio, un aumento de la velocidad de respiración debido a su actividad desacoplante debe llevar a una menor producción de superóxido en la mitocondria, por lo que se ha propuesto que la UCP2 podría ser parte del sistema de defensa antioxidante. Ejemplos de este papel son por una parte el trabajo de Derdak y colaboradores que han observado una posible implicación de la UCP2 en la resistencia de las células tumorales a la quimioterapia. En este proceso, se aprecia que en las células tumorales aumenta la expresión de UCP2 como mecanismo de defensa frente a agentes anticancerosos que actúan provocando estrés oxidativo (Derdak, Mark et al. 2008). Otro ejemplo es la demostración de que la UCP2 protege las células del hipotálamo del daño oxidativo inducido por el TNF- α (Degasperi, Romanatto et al. 2008).

La inducción de la expresión de UCP2 por la leptina, observada por Unger y colaboradores (Zhou, Shimabukuro et al. 1997), podría tener dos explicaciones posibles: **1)** favorecer la oxidación de los ácidos grasos, actuando como un mecanismo disipador de energía o **2)** proteger el adipocito blanco del estrés oxidativo. En este caso, la UCP2 se induciría en respuesta al aumento de ROS provocado por la elevada concentración de ácidos grasos libres. Resaltar que los cambios metabólicos inducidos por la leptina son mediados por la AMPK, una ruta de señalización que es utilizada también por la metformina en su acción antidiabética.

El **Objetivo** de esta tesis, es dilucidar el papel de la UCP2 en el metabolismo energético de la línea celular adipocitaria 3T3-L1 cuando se trata con metformina, analizando el papel en la respuesta al estrés oxidativo y en la regulación del metabolismo lipídico.

MATERIALES Y MÉTODOS

PARTE 1

MATERIALES

1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.1 Línea celular

Para nuestros ensayos se utilizó la siguiente línea celular:

-3T3-L1, fibroblastos embrionarios de ratón (ATCC Cat No. CL-173). Estas células se caracterizan porque pasan de un aspecto de fibroblasto cuando están en activa división a un estado de pre-adipocito durante la diferenciación y de adipocito blanco cuando finaliza el proceso de diferenciación.

1.1.2 Animales de experimentación

Para nuestros ensayos se utilizaron ratones macho C57BL/6 de 14 semanas de vida. Cada uno pesó entre 25-30 gramos. Estos ratones fueron criados bajo unas condiciones térmicas de 22°C y se mantuvieron con un ciclo de iluminación de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad. La alimentación y la bebida les fueron administradas *ad libitum* durante el periodo experimental.

1.2 MATERIAL NO BIOLÓGICO

1.2.1 Agentes y tratamientos celulares

A continuación se detallan los distintos agentes empleados en los ensayos y las condiciones de tratamientos para cada uno de ellos.

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM): Gibco ref. 41966. Medio de cultivo celular constituido por L-glutamina 580 mg/L, glucosa 4.5g/L, piruvato 110 mg/L

Phosphate Buffered Saline (PBS): Se preparó una solución compuesta por NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, NaHPO 10 mM, KH₂PO 2 mM, pH 7.4. Se conservó en frío a 4-8°C.

TRIPSINA/EDTA 0.05%: Gibco ref. 25300

Antibióticos: Gibco ref. 15140. Se encuentran disueltos en una solución fisiológica a una concentración stock de: Penicilina 10000 U/ml, Estreptomicina 10 mg/ml. Se añadieron en el medio DMEM a una concentración final 1% (v/v).

Sueros: Se utilizaron 2 distintos sueros según las condiciones del cultivo celular (ver apartado 2.1.1):

-Suero Fetal Bovino (FBS) Lonza ref. DE14-801F

-Suero Bovino (SB) Gibco ref. 16170-078

Ambos se descomplementaron por calentamiento a 57°C durante 1 hora y se añadieron al medio DMEM a una concentración final 10% (v/v).

Insulina: Sigma ref. I6634. Se preparó un stock de 0.5 mM disuelto en una solución HCl 0.01 M. La insulina se disolvió en el medio de diferenciación a una concentración final de 1 μ M para la diferenciación de los adipocitos.

IBMX: Sigma ref. I5879. Se preparó un stock de 50 mM en PBS. Para que se disolviera adecuadamente fue necesario hervir la solución. Se disolvió en el medio de diferenciación a una concentración final de 1 mM para la diferenciación de los adipocitos.

Dexametasona: Sigma ref. D1756. Se preparó un stock de 2.5 mM en etanol 100%. Se disolvió en el medio de diferenciación a una concentración final de 1 μ M para la diferenciación de los adipocitos.

Metformina: Sigma ref. D5035. Se disolvió fácilmente en agua a una concentración de 0.4 M. Según los tratamientos se usaron distintas concentraciones (ver apartado 2.2.3).

AICAR: Sigma ref. A9978. Este compuesto es un inductor de la AMP-proteín quinasa. Se preparó en agua a una concentración stock de 50 mM y se usó a una concentración de ensayo de 500 μ M. Se utilizó como control de inducción de la AMPK tratando los adipocitos 24 horas.

Compuesto C: Calbiochem ref. 121760. Al contrario del AICAR el compuesto C es un inhibidor de la AMPK. Se disolvió fácilmente en DMSO a una concentración stock de 1 mM y se usó a una concentración final de 20 μ M. En este caso, los adipocitos primero se pre-trataron 30 minutos con este agente y después, transcurrido este tiempo, se añadió la metformina. Por tanto el Compuesto C y la metformina se mantuvieron en el mismo medio durante el tiempo de los tratamientos.

TIRON: Sigma ref. 89460. Se trata de un análogo de la superoxido dismutasa. Se disolvió en agua a 1 mM y se usó a una concentración final 10 veces diluida (100 μ M). Como en el caso del compuesto C, se pre-trataron los adipocitos 30 minutos antes del tratamiento con

la metformina. Sin embargo, en este caso se cambió el medio por nuevo medio de mantenimiento, evitando así que el TIRON estuviera más de 30 minutos en el cultivo.

Rotenona: Sigma ref. R8875. Es un inhibidor del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial e inductor de la formación de radicales libres. Se diluye fácilmente en DMSO a una concentración stock de 1 mM. Como para la metformina se utilizó a distintas concentraciones de trabajo dependiendo del tipo de ensayo (ver apartado 2.2.3).

Oligomicina: Sigma ref. O4876. Este agente inhibe la síntesis de ATP mitocondrial bloqueando la enzima ATPasa (complejo V). Se usó exclusivamente para ensayos de consumo de oxígeno a una concentración final de 1 µg/ml (stock 25 mg/ml en etanol absoluto).

FCCP: Sigma ref. C2920. Es un desacoplante de la respiración mitocondrial. Se usó exclusivamente para ensayos de consumo de oxígeno a una concentración de 400 nM (stock 4 mM en DMSO). Se utilizó como control de la capacidad máxima respiratoria.

Antimicina A: Sigma ref. A8674. Es un inhibidor del complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Se usó exclusivamente para ensayos de consumo de oxígeno a una concentración de 100 nM (stock 1 mM en DMSO).

-El BSA-PALMITATO se constituye preparando primero el BSA a una concentración de 0.34 mM en una solución 150 mM NaCl. Luego se prepara el palmitato sódico a una concentración de 2 mM en una solución 150 mM NaCl. Esta solución de palmitato sódico con la del BSA se mezcla manteniendo la proporción 1:1 para obtener una solución final de palmitato 1mM / BSA 0.17mM.

PARTE 2

MÉTODOS

2.1 TRATAMIENTO CON METFORMINA EN RATONES C57BL/6

Para nuestros ensayos se utilizaron veinte ratones, de los cuales a la mitad de ellos se les inyectó vía introperitoneal una dosis diaria de metformina (250mg/kg de peso del animal) disuelta en solución fisiológica (NaCl 0.9%), mientras que a los otros diez ratones se les realizó una inyección de solución fisiológica (placebo) utilizando el mismo volumen empleado para las inyecciones con la metformina. Los tratamientos se efectuaron a las 10 de la mañana por 3 días consecutivos. 1 hora después de la última inyección se

sacrificaron los animales y se procedió a extraer el tejido adiposo de la zona epididimal. El tejido extraído se congeló rápidamente en nitrógeno líquido hasta su uso experimental.

2.2 CULTIVOS CELULARES

2.2.1 Condiciones de cultivos celulares

Las células fueron cultivadas en una estufa termostatzada a 37°C, en una atmosfera humidificada al 5% de CO₂. Se utilizaron los siguientes medios:

3T3-L1:

Medio de crecimiento: DMEM suplementado con 10% suero bovino (v/v) y Penicilina 100 U/ml - Estreptomicina 100 µg/ml.

Medio de diferenciación I: DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (v/v), Penicilina 100 U/ml - Estreptomicina 100 µg/ml, IBMX 1 mM, Insulina 1µM y Dexametasona 1µM.

Medio de diferenciación II: DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (v/v), Penicilina 100 U/ml - Estreptomicina 100 µg/ml e Insulina 1µM.

Medio de mantenimiento: DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino (v/v) y Penicilina 100 U/ml - Estreptomicina 100 µg/ml.

2.2.2 Técnica de diferenciación celular

Los principios de la técnica de diferenciación de la línea celular 3T3-L1 se encuentran bien descritos en la bibliografía (Ntambi and Young-Cheul 2000). En este sentido se ha puesto de manifiesto que el éxito de la diferenciación radica en la acción conjunta de las distintas hormonas adipogénicas utilizadas:

Insulina: Ejerce su acción sobre el factor de crecimiento de la insulina (IGF-1), aumentando la transcripción de los genes responsable del proceso adipogénico.

Dexametasona: Es un agonista sintético de los glucocorticoides. Se utiliza para estimular las vías de activación de los receptores de los glucocorticoides.

Isobutilmetilxantina (IBMX): Es un potente inhibidor de la AMPc fosfodiesterasa. Se utiliza para estimular la vía de señalización dependiente de la proteína quinasa AMPcK.

De acuerdo con el esquema que se enseña en la TABLA 1, para la diferenciación de fibroblastos a adipocitos blancos, las células se dejaron llegar a confluencia (se considera como el día 0 de diferenciación). Tras 48 horas (día 2 de diferenciación) se cambió el medio de crecimiento por medio de diferenciación I. 48 horas después (día 4 de diferenciación) se cambió el medio a medio de diferenciación II. Pasadas 72 horas (día 7 de diferenciación) se cambió el medio por medio de mantenimiento. A partir del día 9 más del 90% de las células 3T3L1 se habían diferenciado a adipocitos blancos.

TABLA 1:
Fases de la diferenciación de los fibroblastos a adipocitos blancos

Día 0 de diferenciación	Medio de crecimiento	Estado: fibroblasto
Día 2 de diferenciación	Medio de diferenciación I	Estado: fibroblasto
Día 4 de diferenciación	Medio de diferenciación II	Estado: fibroblasto
Día 7 de diferenciación	Medio de mantenimiento	Estado: preadipocito
Día 9 de diferenciación	Medio de mantenimiento	Estado: adipocito blanco
Día 12 de diferenciación	Medio de mantenimiento	Estado: adipocito blanco

2.2.3 Tratamientos de los adipocitos con distintos agentes

Los tratamientos se hicieron tanto en adipocitos en fase de diferenciación como en adipocitos ya diferenciados.

Metformina

-Tratamientos con metformina e insulina durante la diferenciación de las células 3T3-L1.

A partir del día 7 de la diferenciación de las células 3T3-L1 a adipocitos se mantuvo en el medio de mantenimiento la metformina a una concentración de 4 mM y la insulina a una concentración de 1 μ M. Se analizaron las muestras desde el día 7 hasta el día 12 de diferenciación.

-Tratamientos con metformina en adipocitos maduros (ya diferenciados). A partir del día 9 de diferenciación, los adipocitos se mantuvieron en el medio de cultivo con la metformina a una concentración de 1 mM. Se analizaron las muestras a las 2,6,15,24 y 48 horas de tratamiento.

Rotenona

-Tratamientos con rotenona en adipocitos maduros (ya diferenciados) para ensayo de citometría y western blot. El día 9 de diferenciación se trataron 2 horas a 8 μ M

-Tratamientos con rotenona en adipocitos maduros (ya diferenciados). El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos 2 horas a 4 nM. También se utilizó al final de los ensayos conjuntamente con la antimicina A como inhibidor de la respiración a una concentración final de 1 μ M.

2.2.4 Cuantificación de lípidos intracelulares por tinción con el colorante oil red-O

El oil red-O es un colorante que tiñe específicamente grasas neutras y ésteres de colesterol. Se utiliza como marcador de la acumulación de lípidos en el citoplasma de los adipocitos. El oil red-O se preparó a una concentración stock de 8.5 mM (SIGMA Ref. O-0625) en una solución de Isopropanol. A partir de esta solución, el 60% se diluyó en agua para obtener la solución de trabajo.

Para la tinción de los adipocitos blancos con el oil red-O, el día 12 de la diferenciación se eliminó el medio de mantenimiento de las placas e *in situ* se fijaron las células con paraformaldehído 4% toda la noche. Al día siguiente se eliminó el paraformaldehído 4% y se lavaron con 60% isopropanol. Las placas se dejaron secar totalmente y luego se añadió el oil red-O 10 minutos. Tras la tinción con el colorante, se lavó varias veces con agua y se observó al microscopio.

Para cuantificar la acumulación de triglicéridos como índice de conversión de fibroblastos a adipocitos, se utilizó el método de Ramirez (Ramirez-Zacarias, Castro-Munozledo et al. 1992). Este método se basa en la proporcionalidad que existe entre el grado de tinción de la célula con el oil red-O y el grado de diferenciación celular. Para ello se eliminó el agua de las placas y se dejó secar. Se incubó con isopropanol 100% durante 10 minutos y luego se pipeteó varias veces para que todo el oil red-O se diluyera en el isopropanol. Transferido el sobrenadante a un tubo de ensayo se midió la absorbancia de la muestra a 500nm, 0.5 segundos. Como blanco se usó 100% isopropanol y como control una placa vacía teñida de la misma manera.

2.3 TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

2.3.1 Extracción de mitocondrias a partir de adipocitos en cultivo

A partir de una placa petri (diámetro 100 mm) de adipocitos se eliminó el medio de mantenimiento, se lavaron las células con PBS frío y se rasparon con otro ml de PBS frío. La suspensión celular se centrifugó a 2000g 5 minutos y el *pellet* se resuspendió en 1ml de un tampón compuesto por Tris 10 mM, Sacarosa 250 mM pH 7.2 con una mezcla de inhibidores de proteasas compuesta por 4-(2-aminoetil)-benzenesulforilfluoride (AEBSF), pepstatina A, E-64, bestatina, leupeptina y aprotinina (Sigma P8340). Para lisar las células, estas se sometieron a 3 ciclos de choque térmico de la siguiente manera: 5 minutos en Nitrógeno líquido y 10 minutos a 37°C. Después del último paso a 37°C se centrifugó a 750g 10 minutos y el sobrenadante se volvió a centrifugar a 10000g 20 minutos. El *pellet*, rico en extracto mitocondrial, se resuspendió en un volumen final de 30 µl del tampón previamente descrito. Todas las centrifugaciones se hicieron a 4°C. Con este

procedimiento se obtuvieron de media alrededor de 300-400 μg de proteína mitocondrial. Es importante resaltar que estos extractos mitocondriales no presentan mitocondrias enteras, sino que son fragmentos mitocondriales (partes de membranas mitocondriales interna y externa, matriz mitocondrial...). Por este motivo, estos extractos se utilizaron para ensayos bioquímicos (western blot), pero en ningún caso para ensayos bioenergéticos.

2.3.2 Extracción de mitocondrias a partir de tejido adiposo blanco de ratón

El tejido adiposo extraído de los ratones se trocó con una tijeras cuando se encontraba en estado congelado y se homogeneizó en un potter vidrio-teflón en 1 ml de medio de aislamiento previamente preparado (sacarosa 250 mM, EDTA 1 mM, TES 10 mM más la mezcla de inhibidores de proteasas Sigma P8340). A continuación el homogeneizado se centrifugó a 10000g 10 minutos y el *pellet* se resuspendió en 1 ml del mismo medio que se centrifugó a 750g 10 minutos. El sobrenadante se volvió a centrifugar a 10000g 20 minutos. El *pellet*, rico en mitocondrias, se resuspendió en un volumen final de 30 μl del medio de aislamiento. Todo el proceso se hizo a 4°C. Estos extractos mitocondriales finales presentaban una media de 500 μg de proteína mitocondrial. También en este caso cabe destacar que estos extractos no presentan mitocondrias enteras, por lo tanto su uso era limitado a ensayos bioquímicos.

2.3.3 Extracto celular total a partir de adipocitos en cultivo

Se retiró el medio de mantenimiento de las placas petri de cultivos y se lavaron con PBS frío. Se rasparon las células en 1 ml de PBS también frío. Se centrifugó la resuspensión celular a 1500g 5 minutos y el *pellet* se resuspendió en 50-150 μl de un tampón RIPA compuesto por Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, NP40 1%, SDS 0,1% y deoxicolato 1%, suplementado por inhibidores de proteasas (Sigma P8340) además de ortovanadato sódico (Sigma S6508) y NaF (Sigma S7920), que son inhibidores de fosfatasa. Se incubó la suspensión a 37°C durante 15 minutos para potenciar el efecto del tampón de lisis. Después se volvió a centrifugar a 10000g 10 minutos para sedimentar y separar los núcleos. El sobrenadante obtenido se utilizó para los ensayos requeridos. Todo el proceso se hizo a 4°C.

2.3.4 Método de cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas en todos los extractos mitocondriales y celulares se llevó a cabo con el *kit* comercial de Sigma-Aldrich “*Bicinchoninic Acid solution-Copper (II) sulfate solution*” siguiendo el método descrito por Bradford (Bradford 1976).

Este análisis colorimétrico consiste en la capacidad del Coomassie G-25 de unirse a las proteínas. El colorante, en su forma ácida, existe en formas azul y verde. La forma azul es la que une las proteínas y la absorbancia se lee en un rango próximo a 550-590 nm.

Para nuestros ensayos 2-20 μ l de cada muestra se añadieron a la mezcla previamente preparada entre el ácido bicinonínico y la solución de sulfato de cobre. Estos dos reactivos deben utilizarse en una proporción de 50 partes AB:1 parte solución de sulfato de cobre. Para obtener la curva patrón se utilizaron distintas concentraciones de BSA. Los valores de absorbancia de las muestras se cuantificaron a partir de la línea de regresión obtenida de esta curva patrón.

2.3.5 Electroforesis de RNA. Técnica de Northern blot

Debido a la gran cantidad de lípidos presentes en los adipocitos, los RNAs tienen una pureza y rendimiento bajo si se aíslan utilizando protocolos convencionales. Por ello, se utilizó un kit (Aurum RNA Fatty & Fibrous, Kit Cat. #7326830 Bio Rad) específico de extracción de RNA para tejidos grasos. Se siguió el protocolo del manual recomendado en el *kit*.

A partir de una placa petri de adipocitos se eliminó el medio de mantenimiento y se añadieron 2 ml de Purezol para lisar las células. El lisado obtenido se pasó varias veces a través de una jeringuilla con aguja 25G y luego se centrifugó a 12000g 10 minutos a 4°C para eliminar restos de grasa. A continuación se añadieron 200 μ l de cloroformo, se agitó y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. El volumen se centrifugó a 12.000 g durante 15 minutos en frío. Después de la centrifugación aparecen 3 fases: fase acuosa, fase intermedia y fase orgánica. De estas, se coge solamente la fase acuosa y se transfiere a un tubo *ependorf*, añadiendo un volumen igual de etanol al 70%. Este volumen se transfiere a una columna que posee un filtro, cuyos poros son específicos para retener molécula del tamaño de RNA. El intero volumen se centrifuga a 12000 g durante 30 segundos, eliminando así lo que no se retiene en el filtro. A continuación se añadió un tampón de baja astringencia y se centrifugó a 12000 g durante 30 segundos, después se repitió el mismo ciclo con un tampón de alta astringencia. A este punto, se adicionó 30 μ l de una solución que contenía DNAsas para eliminar los restos de DNA retenidos en el filtro y se incubó durante 1 minuto. Al cabo de este tiempo se centrifugó a 12000g durante 1 minuto. Finalmente se añadió una solución de elución, se incubó 1 minutos y se centrifugó durante otro minuto. El sobrenadante obtenido contenía el RNA total de la muestra que presentaba una concentración de aproximadamente 3 μ g/ μ l.

20 µg del RNA total previamente aislado se desnaturalizaron en un tampón constituido por MOPS 20 mM, formaldehído 6.5% y formamida desionizada 50% durante 10 minutos a 65°C y se migraron en un gel de electroforesis 1.2% agarosa en presencia de formaldehído a 120 Voltios.

Una vez que las muestras migraron en el gel se pasó a transferirlas en una membrana de nylon (Hybond-N) en tampón NaCl 150 mM y citrato sódico 15 mM toda la noche.

El día siguiente se sometió la membrana a luz ultravioleta durante 5 minutos para fijar los RNAs y después se prehibridó un mínimo de 4 horas en un tampón con fosfato sódico 0.25 mM pH 6.8, SDS 7%, EDTA 1mM, BSA 1% a 65°C. La sonda utilizada corresponde a la secuencia del cDNA completo de UCP2 de ratón (1.7 Kb) generada por PCR. El marcaje radiactivo de la sonda de ADN se realizó con 25 µCi de ³²P dCTP según el protocolo descrito en el *kit* (Random Prime Labelling System, Cat #RPN1633 Amersham). La hibridación con la sonda radiactiva se llevó a cabo en el mismo tampón de prehibridación a 65°C toda la noche. La mañana siguiente se lavó la membrana 2 veces con un medio de baja astringencia compuesto por SDS 0.1%, NaCl 300 mM y citrato sódico 30 mM, y después se lavó la membrana 2 veces con un medio de alta astringencia compuesto por SDS 0.1%, NaCl 15 mM y citrato sódico 1.5 mM. Cada lavado se efectuó a 65°C durante 15 minutos. La membrana se reveló en un Phosphorimager (Fuji Film FLA-3000).

2.3.6 Western blot e inmunodetección de la proteína UCP2

30 µg de proteínas del extracto de mitocondrias se resolvieron por electroforesis siguiendo el método de Laemmli (Laemmli 1970). Estos 30 µg de proteínas fueron mezclados con la solución solubilizante (glicerol 30%, SDS 1.6%, azul bromofenol 0.3%, beta-mercaptoetanol 5%, Tris 125 mM pH 6.8) y se migraron en un gel SDS-PAGE al 12% poli-acrilamida en presencia de tampón de migración Tris 25 mM, Glicina 190 mM, SDS 0.1%. Este gel consta de dos partes: una parte inferior del gel, llamada separadora y otra parte superior, llamada concentradora. La parte separadora está formada por 12% acrilamida, Tris-HCl 125 mM pH 8.8 y SDS 0.1%, mientras que la parte concentradora por 4% acrilamida, Tris-HCl 100 mM pH 8.8 y SDS 0.1%.

Tras la migración se realizó la transferencia líquida (Electrophoresis Transfer Cell, Cat. #170-3935 Bio Rad) en una membrana de nitrocelulosa 0.45 µm de espesor a 4°C con tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 190 mM, Metanol 20%, pH 8.3), 1 hora a 0.36 Amperios.

Para la inmunodetección, la membrana se bloqueó en un medio con PBS-Tween 1% (PBS-T 1%), 5% leche desnatada en polvo un mínimo de 2 horas a temperatura ambiente. Tras el bloqueo, la membrana se incubó con el anticuerpo primario anti-UCP2 (ver tabla anticuerpos). Se dejó en agitación toda la noche a 4°C. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se lavó la membrana 3 veces con PBS-T 1%. Luego se incubó con el anticuerpo secundario anti inmunoglobulinas G de cabra conjugado con peroxidasa (IgG-HRP, ver tabla anticuerpos), en agitación durante 2 horas. Para eliminar el exceso de anticuerpo se hicieron dos lavados de 15 minutos cada uno con PBS-T 1%.

Las membranas se revelaron con el *kit* comercial ECL (Enhanced Chemiluminescence western Blotting Detection System RNP 2019, Amersham) como descrito en las condiciones que aconseja el fabricante. Este sistema de detección se basa en la emisión de luz que se produce por la oxidación del luminol, catalizada por la peroxidasa unida al anticuerpo secundario, en presencia de H₂O₂. La quimioluminiscencia emitida en este proceso se detectó con el “FujiFilm LAS-3000 analyzer” y se cuantificó por análisis densitométrico con el programa “FujiFilm MultiGauge”.

Como control de la carga y de la riqueza mitocondrial de las muestras cargadas en el gel, se utilizó un anticuerpo monoclonal contra la porina, que es una proteína de la membrana externa mitocondrial que se expresa abundantemente. La membrana utilizada para la inmunodetección de UCP2 se volvió a bloquear en un medio con PBS- T 1% y 5% leche desnatada durante 2 horas. Después, de la misma manera que en las inmunodetecciones anteriormente descritas, se le añadió el anticuerpo primario anti-porina (ver TABLA 2) generado en el conejo y por toda la noche se incubó a 4°C. Al día siguiente se hicieron 3 lavados de 15 minutos cada uno con PBS-T 1%. Luego se añadió el anticuerpo secundario anti-IgG-HRP generado en conejo (ver TABLA 2). Se incubó dos horas a temperatura ambiente y se hicieron 3 lavados de 15 minutos cada uno con PBS-T 1%.

2.3.7 Western blot e inmunodetección de la fosforilación las proteínas quinasas ACC y AMPK

Este método es igual al utilizado para detectar la proteína UCP2, exepcto en los siguientes pasos: Se utilizaron 40 µg de proteínas del extracto celular total que se resolvieron por electroforesis en gel. Estos 40 µg de proteínas fueron mezclados con la solución solubilizante y se migraron en un gel SDS-PAGE al 10% poli-acrilamida para la detección de la proteína AMPK y al 8% poli-acrilamida para la detección de la proteína ACC usando un tampón de migración compuesto por Tris 25 mM, Glicina 190 mM y SDS 0.1%.

Para la inmunodetección, las membranas se bloquearon en un medio con TBS (Tris-HCl 200 mM, NaCl 1.5 M a pH 7.6), Tween 1% (TBS-T 1%), 5% leche desnatada en polvo durante 3 horas. Tras el bloqueo, se hicieron 2 lavados de 15 minutos con TBS-T 1% antes de incubar toda la noche a 4°C en TBS-T 1% y 4% albúmina bovina (BSA) las membranas con los anticuerpos primarios anti-pACC (ver tabla) o anti-pAMPK (ver tabla). Estos anticuerpos detectan la forma fosforilada de las proteínas. Para eliminar el exceso de anticuerpo primario, se lavaron las membranas 3 veces con TBS-T 1%. Luego se incubaron ambas membranas con el anticuerpo secundario IgG-HRP generado en cabra (ver tabla). Se dejó incubando en agitación durante 2 horas en TBS-T 1% y 4% BSA. Después se hicieron tres lavados de 15 minutos cada uno con TBS-T 1%.

Como control de la carga proteica de las muestras migradas en el gel, se utilizó el anticuerpo anti-AMPK (ver TABLA 2) que detecta la forma total (fosforilada y no fosforilada) de cada proteína. La membrana se volvió a bloquear en un medio que tuviese TBS- Tween 1% y 5% leche desnatada en polvo 2 horas. A continuación se le añadió EL anticuerpo primario anti-AMPK. Se incubó toda la noche a 4°C y al día siguiente se procedió a lavar tres veces durante 15 minutos cada uno con TBS-T 1%. Luego se añadió el anticuerpo secundario IgG-HRP generado en cabra (ver tabla). Se incubó una hora a temperatura ambiente y se hicieron 3 lavados de 15 minutos cada uno con TBS-T 1%.

El método de revelado fue el mismo que el empleado para la detección por western blot de la proteína UCP2.

TABLA 2:
Anticuerpos primarios

Proteína	Origen	Dilución	Casa comercial
UCP2	cabra	1:500	Santa Cruz
Porina	conejo	1:4000	Sigma
p-AMPK	conejo	1:1000	Cell Signaling
p-ACC	conejo	1:1000	Cell Signaling
AMPK	conejo	1:1000	Cell Signaling

Anticuerpos secundarios

Anticuerpos	Origen	Dilución	Casa comercial
Anti IgG cabra	burro	1:10000	Santa Cruz
Anti IgG conejo	cabra	1:4000	Bio Rad

2.4 MEDIDAS DE ESTRÉS OXIDATIVO

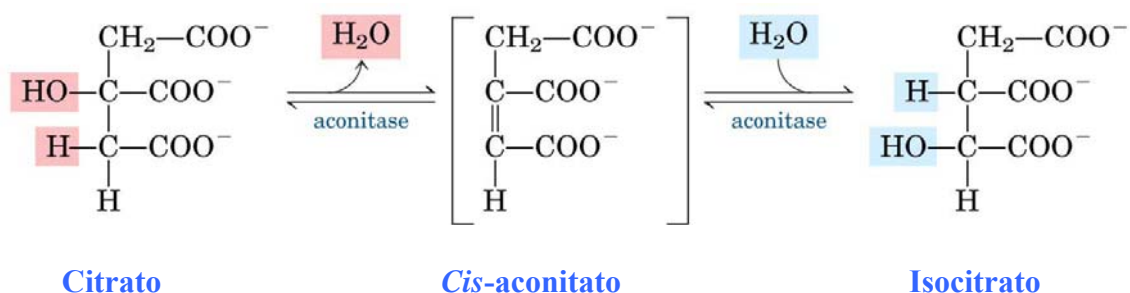
2.4.1 Detección de las especies reactivas del oxígeno por citometría de flujo

Para medir los niveles de ROS se utilizó la sonda fluorescente hidroetidio o dihidroetidina (DHE). Esta sonda es altamente específica para detectar y evaluar la generación de radical superóxido, además que las otras ROS. La DHE en condiciones no oxidantes se encuentra en el citoplasma y muestra una fluorescencia azul. Cuando reacciona con las ROS se oxida a etidio, se intercala en el ADN celular y cambia a fluorescencia roja. Dicha fluorescencia emitida por este agente se detectó en un citómetro de flujo EPICS-XL Coulter (Florida, USA) que opera a 200 mW usando un láser de excitación de argón a 488 nm y un filtro con pico de emisión de 590 nm.

Para el ensayo de citometría, las muestras de los adipocitos en cultivo se prepararon lavando primero la placa petri con PBS, levantando las células de la misma placa con tripsina y centrifugándolas en su medio de mantenimiento a 1000 rpm 5 minutos (la proporción medio:tripsina en el volumen final de centrifugado es 3:1). El *pellet* de células se resuspendió en medio de mantenimiento sin suero y se repartieron 1 millón de células por ml en tubos específicos para el ensayo. La sonda se añadió a las células a una concentración final de 5 μ M y se incubó a 37°C en oscuridad durante 30 minutos. Pasada la media hora se volvió a centrifugar a 1000 rpm 5 minutos para eliminar el exceso de sonda y se resuspendió cada *pellet* de células en 500 μ l de medio de mantenimiento. Los tubos se mantuvieron en hielo hasta que se efectuaron las medidas inmediatamente.

2.4.2 Actividad de la aconitasa en gel de electroforesis

La aconitasa es una enzima soluble de la matriz mitocondrial que interviene en el ciclo de Krebs. Introduce reversiblemente una molécula de agua sobre un doble enlace de una cadena carbonada en la reacción de producción de isocitrato a partir del precursor citrato, a través del intermediario *cis*-aconitato unido al enzima. Su actividad es altamente sensible al anión superóxido, que causa daño en los centros hierro-azufre (Fe-S) del enzima, provocando su inactivación.



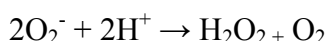
Para medir la actividad de la aconitasa se utilizó el método descrito por Tong (Tong, Jameson et al. 2003). El principio de este método se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-ilo)-2-5 difeniltetrazol (MTT) realizada por la aconitasa. El efecto de esta reducción se observa en una banda de color azul en el mismo gel. Por tanto si el enzima es más activo la banda será más intensa y viceversa.

A partir de un extracto enriquecido en mitocondrias se preparó un gel de electroforesis vertical con la parte separadora (o inferior) al 8% acrilamida, Tris-HCl 125 mM pH 8.8, citrato 3.6 mM y borato 125 mM, mientras que la parte concentradora (o superior) al 4% acrilamida, Tris-HCl 100 mM pH 8.8, citrato 5 mM y borato 100 mM. La electroforesis se migró a 180 Voltios durante 4 horas a 4°C en un tampón compuesto por Tris 25 mM, glicina 190 mM y citrato 3.6 mM.

Terminada la electroforesis el gel se sumergió rápidamente en una solución acuosa preparada en el momento, que contenía Tris-HCl pH 8.8 100 mM, NADP 1 mM, ácido cis-aconítico 2.5 mM, MgCl₂ 5 mM, MTT 1.2 mM, Fenazina metosulfato 0.3 mM e isocitrato dehidrogenasa 5 U/ml. Al cabo de 30 minutos aparecieron en el gel unas bandas de color morado que, como explicado anteriormente, correspondían a la actividad de la aconitasa. Dichas bandas se analizaron con el “FujiFilm LAS-3000 analyzer” y se cuantificaron por análisis densitométrico con el programa “FujiFilm MultiGauge”.

2.4.3 Actividad de la superóxido dismutasa

Las superóxido dismutasas son metalo-enzimas que catalizan la dismutación del radical superóxido en peróxido de hidrógeno.



Para la medida de la actividad de la MnSOD y Cu/Zn SOD se utilizó el kit “SOD Assay Kit II” de la casa comercial Calbiochem que se basa en el método descrito por Spitz (Spitz and Oberley 1989). Según este método, la xantina oxidasa y la hypoxantina se utilizan para la generación de radical superóxido. Por otro lado la sal azul de tetrazolium nitrado (NBT) es el detector de este radical, que, en contacto con dicho radical se reduce generando un compuesto de color azul intenso, el azul de formazan. En este método se miden los niveles del NBT reducido en cada muestra. Por tanto cuanto mayor sea la actividad de las SODs, menor será la reducción del NBT.

A partir de un extracto celular total preparado en un tampón de lisis constituido por HEPES 20 mM pH 7.2, EGTA 1Mm, manitol 210 mM, glucosa 70 mM, se procedió a

medir la actividad de la SOD en placas de 96 pocillos siguiendo las instrucciones recomendadas en el *kit*. Se leyó la absorbancia de cada pocillo simultáneamente a 450 nm en el lector de placa “Varioskan Flash 377” distribuido por la casa comercial Thermo Scientific.

A partir de los valores de la curva patrón generada utilizando concentraciones seriadas de SOD comprendida entre 0 y 0.25 U/ml, calculamos la actividad del enzima por cada muestra analizada, basandonos en los valores de las absorbancias obtenidas para cada una de ella.

2.4.4 Cuantificación del glutatión total

El glutatión reducido (GSH) es utilizado por la glutatión peroxidasa para reducir tanto el peróxido de hidrógeno como el lipoperóxido, transformándolo en agua y en su respectivo alcohol. Durante este proceso el glutatión reducido es oxidado (GSSG). El oxidado se convierte de nuevo a reducido por medio de la glutatión reductasa y NADPH. Por tanto, cuando las células de mamífero están expuestas a un incremento del estrés oxidativo el ratio GSH/GSSG disminuye como consecuencia de la acumulación del GSSG.



Para analizar el glutatión oxidado y el total se utilizó un *kit* comercial (GSH/GSSG-412 OXIS Research) que se basa en el método descrito por Tietze (Tietze 1969). Este método mide la cantidad de NADPH oxidado que se detecta a través de una lectura espectrofotométrica a 412 nm. Debido a que la cantidad de NADPH oxidado es proporcional a la cantidad de glutatión oxidado, las medidas de las absorbancias de las muestras informan sobre la cantidad de glutatión oxidado.

Para medir correctamente el glutatión oxidado se lisaron las células según el método de extracción celular total descrito en el apartado 2.3.3. 50 µl del lisado celular se trataron con 5 µl de 1-metil-2-vinilpiridina, que elimina de la muestra el glutatión reducido sin interferir con la actividad de la glutatión reductasa. Gracias a este agente se consiguió detectar pequeñas variaciones de GSSG, a pesar de que sus concentraciones intracelulares son siempre muy bajas y difíciles de estimar correctamente. Para cuantificar el GSH total se cogieron 55 µl del mismo lisado celular, pero no se trataron las muestras con la 1-metil-2-vinilpiridina.

Para calcular el GSH total y el GSSG se tomaron 12 lecturas de absorbancia a 412 nm a intervalos de 15 minutos. También en este caso, a partir de los valores de la curvas patrón generadas utilizando concentraciones seriadas de GSH total (rango 0-3.0 µM) y GSSG

(rango 0-1.5 μM) respectivamente, calculamos la concentración del glutatión oxidado y total por cada muestra analizada, basandonos en los valores de las absorbancias obtenidas para cada una de ella.

2.4.5 Medida de apoptosis celular por citometría de flujo

Para los ensayos de apoptosis celular elegimos el *kit* “Vibrant Apoptosis Assay Kit 2” de Molecular Probes, que utiliza los fluorocromos alexafluor 488 (emisión 488 nm) e ioduro de propidio (emisión 580 nm) para detectar la fase temprana y tardía del proceso.

En primer lugar, para detectar la fase temprana de la apoptosis el *kit* proporciona la anexina V conjugada con el fluorocromo Alexa fluor 488. Como es conocido un proceso típico del inicio de la apoptosis consiste en la translocación del fosfolípido de membrana fosfatidilserina desde la cara interna hacia la cara externa de la membrana plasmática. La anexina V es una proteína que se une específicamente a este fosfolípidos, de manera que al producirse la unión, el fluorocromo Alexa fluor 488 emite fluorescencia. Por tanto la intensidad de la emisión de la fluorescencia de este fluorocromo es proporcional a las uniones anexina V-fosfatidilserina.

El ioduro de propidio (PI) es un marcador de apoptosis tardía y necrosis. De hecho este es impermeable a la membrana plasmática, pero entra en la célula y se incorpora al ADN sólo cuando la membrana plasmática es totalmente permeable (situación de apoptosis en su fase final).

La combinación de la fluorescencia de estos dos fluorocromos (ambas medidas en el citómetro de flujo EPICS-XL Coulter. Florida, USA) nos proporcionó la información necesaria para determinar el grado de apoptosis del cultivo celular en función de los distintos tratamientos.

Las muestras para cada ensayo se prepararon siguiendo el mismo método descrito en el apartado 2.4.1.

2.5 ANÁLISIS DEL METABOLISMO CELULAR

2.5.1 Medida de liberación de glicerol como índice de lipolisis

Durante la lipólisis, los triglicéridos son hidrolizados para formar glicerol y ácidos grasos. Nuestros ensayos se basaron en el método descrito por Wieland (Wieland 1957), que permite estimar los niveles de glicerol libre en el medio de cultivo. Consiste en dos reacciones enzimáticas donde primero la gliceroquinasa (GK), en presencia de ATP y glicerol, forma como productos intermedios el glicerol-3-fosfato y ADP. La α -

glicerolfosfato dehidrogenasa (GDH) cataliza la segunda reacción enzimática en presencia de NAD formando como productos finales el dihidroxiacetonafofato (DAP) y NADH. Este último producto es proporcional a la cantidad de glicerol presente en la muestra.

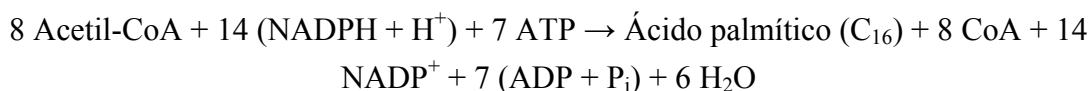


La mezcla reactiva se preparó justo antes de usarla y contenía: ATP 1.23 mM, NAD 0.56 mM, GDH 5 Unidades/ml, GK 351 Unidades/ml, todo disuelto en un volumen final de 1 ml de tampón compuesto por Hidrato de Hidracina 1 M, Glicina 0.2 M y Cloruro de Magnesio 2 mM. A 950 µl de la mezcla reactiva se añadieron 50 µl del sobrenadante de las células tratadas. Esta mezcla se dejó incubar 40 minutos a temperatura ambiente y luego se procedió a leer a 340 nm la absorbancia del NADH en un espectrofotómetro.

A partir de los valores de la curva patrón generada utilizando concentraciones seriadas en un rango comprendido entre 0 y 0.1 µmol de glicerol 10 mM (Merck 1.04094.1000) se cuantificaron los valores de glicerol libre de las muestras, basandonos en los valores de las absorbancias obtenidas para cada una de ella.

2.5.2 Actividad de la ácido graso sintasa (FAS)

La ácido graso sintasa es un polipéptido multienzimático que se encarga de la síntesis del ácido palmitico, del cual derivan lo demás ácidos grasos. La síntesis se lleva a cabo en el citosol por adición de 2 carbonos aportados por el acetil-CoA y se gastan 7 ATP y 14 NADPH. Su actividad se regula en función del estado metabólico celular.



Para realizar esta análisis utilizamos el método descrito por Nepokroeff (Nepokroeff, Lakshmanan et al. 1975) y más recientemente por An (An, Wang et al. 2007), aunque fue adaptado a nuestras condiciones experimentales. Este método se basa en medir la oxidación del NADPH, que es proporcional a la actividad de la FAS.

Las células fueron primero lavadas con PBS frío y después lisadas en un tampón constituido por sacarosa 250 mM, ditiotreitól 1 mM, EDTA 1mM y fluooruro de

fenilmetilsulfonil 100 μ M. Se pipetearon 50 μ l del lisado en un *eppendorf* limpio y este se puso a agitar en un plato agitador durante 15 minutos a velocidad media. Finalizada la agitación, se centrifugó a 16000g 15 minutos en frío y el sobrenadante se pasó a otro *eppendorf* limpio. Debido a que el ensayo se realizó en placas de 96 pocillos se preparó una mezcla reactiva ajustando el volumen a 200 μ l por pocillo. Primero se diluyó dos veces la muestra en un tampón fosfato KHPO_4^- 60 μ M y sucesivamente se añadió acetil-CoA 0.375 nM y malonil-CoA 0.1 nM. Después de agitar 5 minutos se procedió a añadir el NADPH 0.5 nM y rápidamente medir la absorbancia a 340 nm en el lector de placas “Varioskan Flash 377” de la casa comercial Thermo Scientific. El NADPH se preparó justo antes del ensayo y se pipeteó en los pocillos justo antes de la medida para evitar que se oxidara antes del ensayo.

La lectura de la absorbancia es proporcional a la oxidación del NADPH. Para determinar la oxidación del NADPH en el tiempo se efectuaron 30 lecturas por minuto y se representaron como coordenadas del sistema de referencia cartesiano de 2 ejes (X,Y). De este gráfico resultante se utilizó sólo la parte lineal, mientras que para calcular la actividad de la FAS se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{nmoles NADPH oxidado/min/mg} = [((\Delta A_{340}/\text{min})/0.00373)*FD]/\text{mg proteína}$$

Donde:

$-\Delta A_{340}/\text{min}$ es igual al $\text{Abs } 340 \text{ nm } T_2 - \text{Abs } 340 \text{ nm } T_1 / T_2 - T_1$, donde T_1 y T_2 son el tiempo inicial y final de la parte lineal del gráfico.

-0.00373 es el coeficiente de extinción de NADPH ajustado en función del paso óptico del pocillo que es 0.6 cm. La constante de extinción del NADPH de la cual se ha derivado este valor es $0.00622 \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

$-FD$ es el factor de dilución de cada muestra, que en nuestros ensayos correspondía a 10.

2.5.3 Medida del ATP celular

Se utilizó el *kit* comercial “ATP Bioluminescence Assay Kit HS II-Roche” altamente sensible a la detección de concentraciones de ATP intracelulares. Se basa en una reacción de bioluminiscencia donde la luciferasa promueve la formación de oxiluciferina (DeLuca and McElroy 1974; DeLuca and McElroy 1984):



La reacción produce luminescencia que emite a una longitud de onda de 562 nm y es directamente proporcional a la concentración de ATP celular. Se utilizaron para este tipo de ensayo unas placas multipocillo de fondo negro especial para luminiscencia (*96F nontreated Black microwell* – NUNC).

La preparación del lisado celular empezó lavando la placa de cultivo con PBS frío después de haber eliminado el medio de mantenimiento. Con 1 ml de PBS se raspó la superficie de la placa y una vez resuspendido homogéneamente el volumen se cogieron 20 µl y se mezclaron con 80 µl de un tampón de dilución proporcionado por el *kit*. El volumen final de 100 µl se mezcló con otros 100 µl del tampón de lisis del *kit*. Se mantuvo incubando 5 minutos a 25°C antes de centrifugar a 10000g 5 minutos a 4°C. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se utilizó para el ensayo.

De este sobrenadante se utilizaron 50 µl y se mezclaron con 50 µl de la enzima luciferasa. Las condiciones del ensayo se optimizaron de tal forma que la luciferasa se añadía en un pocillo y se efectuaba la medida de luminiscencia del mismo pocillo antes de añadirla en el siguiente pocillo. Así se repitió por el total de pocillos presentes en la placa de ensayo. Para el análisis de los datos se realizó una curva patrón utilizando concentraciones seriadas de ATP en un rango comprendido entre 10^{-6} y 10^{-12} M.

2.6 ESTUDIO DE PARÁMETROS BIOENERGÉTICOS

2.6.1 Medida de consumo de oxígeno en células en cultivo

Para los ensayos de análisis de consumo de oxígeno se utilizó el aparato “XF24 Extracellular Flux Analyzer” fabricado por la casa comercial “Seahorse Bioscience”. Este novedoso analizador permite medir consumo de oxígeno (OCR) y glicólisis por acidificación del medio extracelular (ECAR) directamente en cultivos de células adherentes y en monocapa.

Las placas de 24 pocillos XF24, donde se cultivan las células para el ensayo, presentan un diseño particular. Cada pocillo tiene la parte inferior en forma de cono truncado, con la base menor que mide 6 mm de diámetro. En esta base adhieren y proliferan las células. La otra parte del pocillo se abre con más amplitud de superficie hasta la parte superior del pocillo que mide 16 mm de diámetro. Este diseño está realizado de tal manera que se minimizan los errores de lectura debidos a la formación de burbujas de aire o turbulencias en el medio.

Encima de esta placa se acopla un cartucho que consta de 24 partes idénticas constituida por:

-1 cilindro central que posee 2 sondas fluorescentes, de las cuales una mide consumo de oxígeno y la otra acidificación del medio extracelular. Estas sondas están embebidas dentro de una resina con lo cual es necesario hidratarlas antes del experimento. Para ello se hidratan los cartuchos en un medio de equilibrado (XF24 Calibrant Solution pH 7.4) durante un mínimo de 5 horas.

-4 inyectores posicionados alrededor del cilindro central, que permiten adicionar hasta 4 reactivos distintos por pocillo. Los 4 inyectores se dividen en puerto A, B, C y D. El equipo permite añadir simultáneamente a los 24 pocillos el agente que se desee de cada puerto.

A



B



Fig. 2 (A) Analizador XF24. **(B)** Dibujo de la placa de ensayo donde se puede distinguir la peculiar forma de cada pocillo, las células en monocapa en el fondo del pocillo, el cilindro central y los inyectores (visibles sólo dos) unidos al cilindro central.

El principio en que se basa este aparato es muy complejo. Cada ciclo de medida se compone de:

Agitación: El cilindro central, a través de movimientos horizontales y verticales consigue una agitación del medio para que sea siempre homogéneo. Puede durar entre 2 y 5 minutos.

Espera: Es el intervalo de tiempo entre la agitación y la medida. Es necesario para que no haya turbulencia en el medio y se obtengan medidas erróneas. Suele durar 2-3 minutos.

Medida: En este caso las 2 sondas sumergidas en el medio consiguen medir en un “microentorno” de aproximadamente 7 μ l los cambios de pH y consumo de oxígeno. Por tanto en este volumen el aparato adquiere una altísima sensibilidad que permite detectar

mínimas variaciones de los parámetros OCR y ECAR. La medida por tanto es rápida (22 segundos) y se pueden repetir a intervalos de 2-5 minutos.

Debido a que el aparato mide cambios de pH, el medio del ensayo que se utiliza es un medio DMEM sin bicarbonato (no tamponado) a pH 7.4 y libre de suero, suplementado con piruvato sodico 1 mM, glutaMax-1 2 mM, NaCl 31 mM y glucosa 25mM.

Para la preparación del ensayo se utilizaron adipocitos 3T3-L1.

Los adipocitos se diferenciaron según descrito previamente. El día siete de la diferenciación se levantaron con PBS y se plaquearon en la placa de cultivo de 24 pocillos XF24. Se plaquearon 90.000 células por pocillo y se dejaron en cultivo 48 horas en medio de mantenimiento. El día 9 de la diferenciación se procedió a efectuar tratamientos de 2,6,15,24 y 48 horas con metformina 1 mM.

En todos los casos el día del ensayo se eliminó de las palcas de cultivo el medio de mantenimiento (ver apartado 2.2.1) y se reemplazó con DMEM sin bicarbonato previamente descrito, echando en cada pocillo 675 μ l. La placa se dejó en una estufa a 37°C 1 hora.

Cada puerto del “cartucho” se cargó con los agentes deseados, que se prepararon previamente en el medio de ensayo no tamponado, anteriormente descrito. Para nuestros experimentos se cargaron los puertos siempre de la misma manera:

-PUERTO A: DMEM SIN BICARBONATO, 75 μ l

-PUERTO B: OLIGOMICINA 10X, 83 μ l de una concentración 10 μ g/ml (en el pocillo se obtiene una concentración final de 1 μ g/ml)

-PUERTO C: FCCP 10X, 92 μ l de una concentración 4 μ M (en el pocillo se obtiene una concentración final de 400 nM)

-PUERTO D: ROTENONA 10X + ANTIMICINA A 10X, 103 μ l de una mezcla de los dos inhibidores de una concentración de 10 μ M para la rotenona y de 10 μ M para la antimicina A (en el pocillo se obtiene una concentración final de 1 μ M para cada uno)

Las inyecciones siguieron el orden marcado, así que primero se midió el consumo de oxígeno basal. Después de echar la oligomicina obtuvimos los valores del consumo de

oxígeno en ausencia de síntesis de ATP. Con el FCCP conseguimos la respiración máxima que podían alcanzar nuestras células, y por último con rotenona + antimicina A se bloqueaban los complejos I y III para obtener la inhibición completa de la respiración. Entre una inyección y la siguiente se tomaron entre 4 y 5 medidas con intervalos de 5 minutos.

Para analizar el efecto de la metformina y de la rotenona en el tiempo, inyectamos directamente en los cultivos a través del puerto A estos dos agentes. Tomamos medidas cada 10 minutos hasta cumplir las 2 horas. Para ello en el puerto A se puso metformina 1mM o rotenona 4nM en lugar de medio no tamponado. El resto de los puertos se cargaron de la misma forma que el esquema anterior.

Todos los valores de OCR se refirieron en nmoles O₂/min/mg de proteína. Por este motivo, después de cada ensayo se cuantificó la proteína en cada pocillo según el método del BCA descrito en el apartado 2.3.4.

2.6.2 Medida de oxidación de los ácidos grasos

Esta medida se basa en el análisis de consumo de oxígeno en respuesta al palmitato como sustrato, medido por el aparato “Extracellular Flux Analyzer XF24”. Para estos estudios se utilizaron solamente los adipocitos como modelo celular. Como descrito anteriormente el día 7 de la diferenciación se plaquearon 80.000 células por pocillo y se dejaron en cultivo 48 horas en medio de mantenimiento. El día 9 de la diferenciación se procedió a efectuar tratamientos de 2,6,15,24 y 48 horas con metformina 1 mM.

El día del ensayo se eliminó el medio de mantenimiento y se reemplazó por un medio KHB pH 7.4 constituido por NaCl 111 mM, KCl 4.7 mM, MgSO₄ 2 mM, Na₂HPO₄ 1.2 mM, glucosa 2.5 mM y L-carnitina 0.5 mM. En cada pocillo se echaron 600 µl. Los distintos agentes fueron previamente preparados en el medio KHB a la misma concentración final usada en el ensayo de respiración celular. Para iniciar la oxidación se añadió en el puerto A palmitato conjugado con albumina (BSA 0.17 mM / PALMITATO 1 mM), que se preparó siguiendo el método descrito en el apartado 1.2.1

Los 4 puertos se cargaron siguiendo este esquema:

-PUERTO A: BSA-PALMITATO 5X, 75 µl (en el pocillo se obtiene una concentración final de 0.1 mM palmitato/17µM)

-PUERTO B: BSA-PALMITATO5X, 75 μ l (en el pocillo se obtiene una concentración final de 0.1 mM palmitato/17 μ M)

-PUERTO C: FCCP10X, 83 μ l de una concentración 4 μ M (en el pocillo se obtiene una concentración final de 400 nM)

-PUERTO D: ROTENONA 10X + ANTIMICINA A 10X, 92 μ l de una mezcla de los dos inhibidores de una concentración de 10 μ M para la rotenona y de 10 μ M para la antimicina A (en el pocillo se obtiene una concentración final de 1 μ M para cada uno)

Debido a que el medio KHB es un medio mínimo (o esencial), la adición de palmitato nos permitió observar cual es la capacidad de los adipocitos para oxidar el palmitato en función de los distintos tratamientos. También en este caso entre una inyección y la siguiente se tomaron entre 4 y 5 medidas con intervalos de 5 minutos.

2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.7.1 Método empleado

La significación estadística entre las diferentes condiciones experimentales se calculó mediante el test de la *t-student*, considerando significativos los valores de $p < 0.05$. Las diferencias significativas se representaron mediante asteriscos, cuyo significado es * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

PARTE 1

CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR ADIPOCITARIA 3T3-L1

1.1 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DE LA DIFERENCIACIÓN

El punto de partida de nuestro estudio fue comprobar la correcta diferenciación de la línea celular 3T3-L1. Como se comentó en el apartado 1.1.2 de los Materiales y Métodos, se trata de una línea celular de ratón (*Mus musculus*) que proviene de la cepa 3T3 (Swiss albino). Estas células tienen la capacidad de pasar de un estado de fibroblastos a un estado de adipocito a través de unas etapas intermedias en las cuales se aprecian importantes cambios morfológicos. La acumulación de lípidos en el interior de la célula es garantido por la acción conjunta de las hormonas IBMX, dexametasona e insulina, además de una concentración elevada de suero fetal bovino (10%).

La figura R1 recoge las imágenes más representativas del proceso de diferenciación. Se observa como en las primeras fases de la diferenciación los fibroblastos alcanzan un estado de alta densidad (Fig. R1, A, día 0) y forman una monocapa homogénea (Fig. R1, B, día 2). El día 4 de diferenciación, antes de reemplazar el medio de diferenciación I por el medio de diferenciación II, las células adquieren un tamaño más pequeño, una forma a estrella y están más separadas entre si (Fig. R1, C). A partir del día 7 de diferenciación (antes de eliminar el medio de diferenciación II) las células vuelven a formar una monocapa y se empiezan a notar pequeñas gotas de grasa fácilmente distinguible por su brillantez (Fig. R1, D, estado de preadipocito). El día 9 ya se ha alcanzado un estado de adipocito maduro (Fig. R1, E, más del 90% de las células están diferenciadas a adipocitos), donde cada uno presenta un alto número de gotas lipídicas en su citoplasma. Finalmente, el día 12 el adipocito difiere poco en su aspecto con respecto al día 9 y adquiere una forma más redonda (Fig. R1, F).

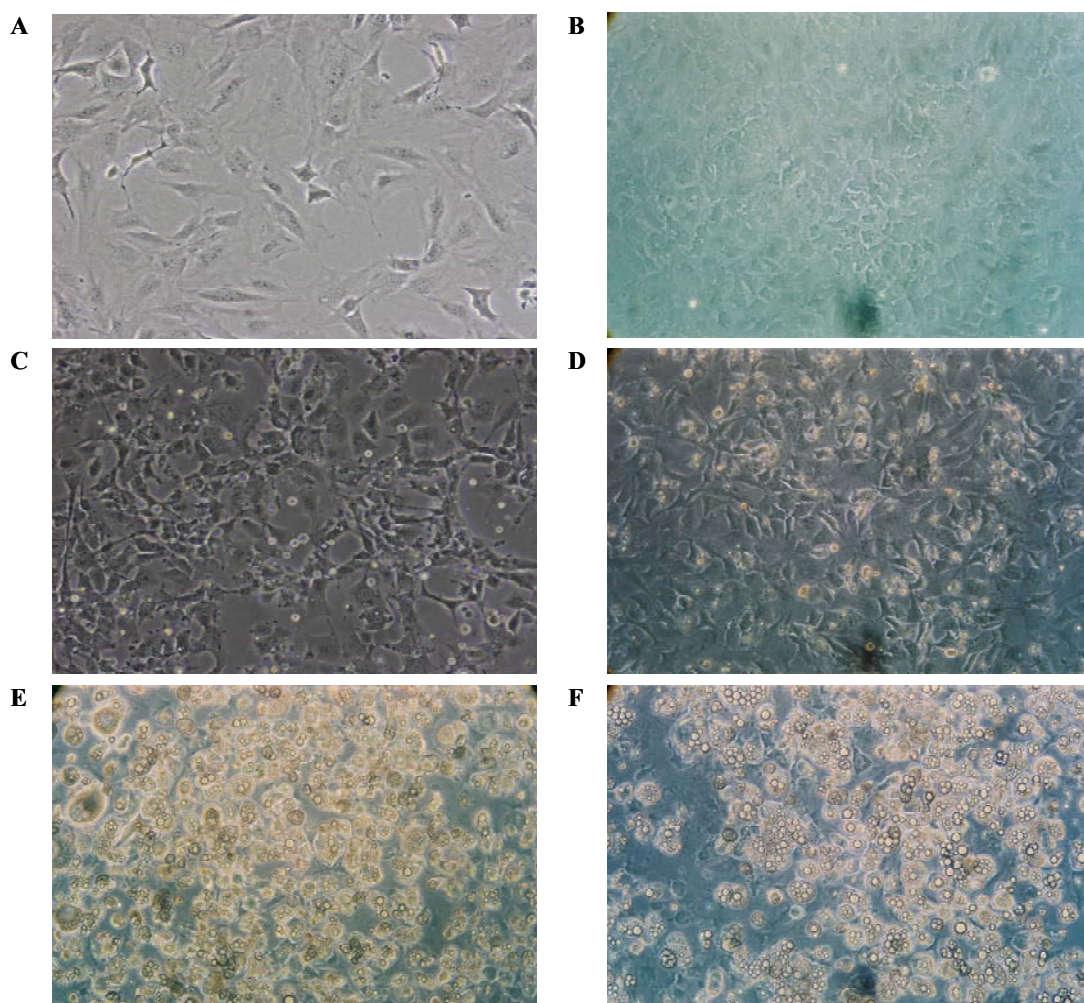


Fig. R1. Diferenciación de la línea celular 3T3-L1 fibroblastos a adipocitos blancos. (A) Día 0 de diferenciación. (B) Día 2 de diferenciación. (C) Día 4 de diferenciación. (D) Día 7 de diferenciación. (E) Día 9 de diferenciación. (F) Día 12 de diferenciación.

1.2 NIVELES BASALES DE LA EXPRESIÓN DE UCP2 ANTES Y DESPUÉS DEL PROCESO DE DIFERENCIACIÓN

Con el fin de determinar los niveles de expresión de la UCP2 en esta línea celular y cual son sus niveles basales antes y después de la diferenciación, se procedió a diferenciar en placas petri los 3T3-L1 fibroblastos a adipocitos según el protocolo descrito en el apartado 2.2.2 de los Materiales y Métodos. Cuando se llegó al día 12 de la diferenciación, se analizaron los niveles de proteína por western blot y los de mRNA por northern blot. Los resultados evidenciaron que, tanto los niveles proteicos como los niveles de mensajero de UCP2, son más altos en adipocitos que en fibroblastos (Fig. R2, A y B).

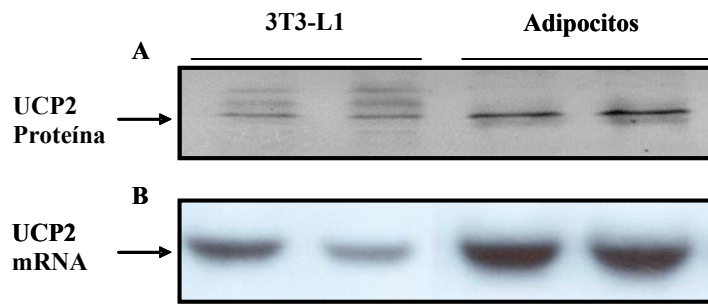


Fig. R2. La UCP2 presenta un patrón de expresión más alto en los adipocitos blancos. (A) Niveles de expresión de la proteína UCP2 en células 3T3-L1 antes de la diferenciación y en adipocitos después del día 12 de la diferenciación, analizados por western blot.

(B) Niveles de mRNA de UCP2 en células 3T3-L1 antes de la diferenciación y en adipocitos después del día 12 de la diferenciación, analizados por Northern blot.

1.3 NIVELES BASALES DE LA UCP2 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN

El hecho de que la UCP2 esté regulada a nivel traduccional (Hurtaud, Gelly et al. 2006) comporta que un aumento en los niveles del RNA mensajero no siempre coinciden con un aumento de la proteína y viceversa. Por este motivo se decidió seguir nuestro estudio investigando la UCP2 solamente a nivel de proteína.

Como se ha descrito anteriormente, el proceso de diferenciación empieza el día 0, pero los cambios morfológicos que presenta el fibroblasto para alcanzar un estado de adipocito se empiezan a notar solamente a partir del día 7. Debido a que nuestro estudio se centra en el adipocito blanco, se analizó la expresión de UCP2 a partir del día 7 hasta el día 12 de diferenciación.

Así que dentro del rango establecido (día 7-12 de diferenciación) se analizaron los niveles proteicos de UCP2 por western blot. Los resultados no mostraron diferencias en el patrón de expresión de la proteína como se muestra en el western blot representativo de la figura R4, A.

PARTE 2

EFFECTOS DE LA METFORMINA EN EL ADIPOCITO BLANCO

2.1 LA METFORMINA INHIBE LA ADIPOGÉNESIS DURANTE LA DIFERENCIACIÓN

Una vez caracterizada nuestra línea celular, se procedió a determinar las condiciones experimentales por las cuales se inducen la expresión de UCP2 y el metabolismo lipídico. Para ello se utilizó la metformina, puesto que estimula el metabolismo lipídico a través de la activación de la AMPK (Zhou, Myers et al. 2001; Zou, Kirkpatrick et al. 2004).

Por lo tanto, se procedió a tratar los adipocitos con metformina a una concentración de 4 mM en el rango de tiempo establecido (día 7-12 de diferenciación). Sin embargo, el uso de la metformina en nuestras condiciones experimentales originó un problema. El día 7 de diferenciación corresponde a la fase en la cual las células empiezan a tener una morfología similar al adipocito blanco, pero para su completa maduración necesitan otros 2 días. Con la metformina presente en el medio de cultivo a partir del día 7 de diferenciación, no se obtuvo una maduración completa de los adipocitos. Si en condiciones normales obteníamos más del 90% de células diferenciadas, con la metformina presente en el medio este porcentaje se reducía al 50%. Ya que necesitábamos contar con un alto número de adipocitos, decidimos mantener la insulina 1 μ M en el medio de mantenimiento, en lugar de quitarle a partir del día 7 de diferenciación, como hacíamos en las condiciones normales. Con estas nuevas condiciones, el porcentaje de adipocitos diferenciados mejoraba hasta alcanzar un 75% de células diferenciadas a adipocitos (Fig. R3).

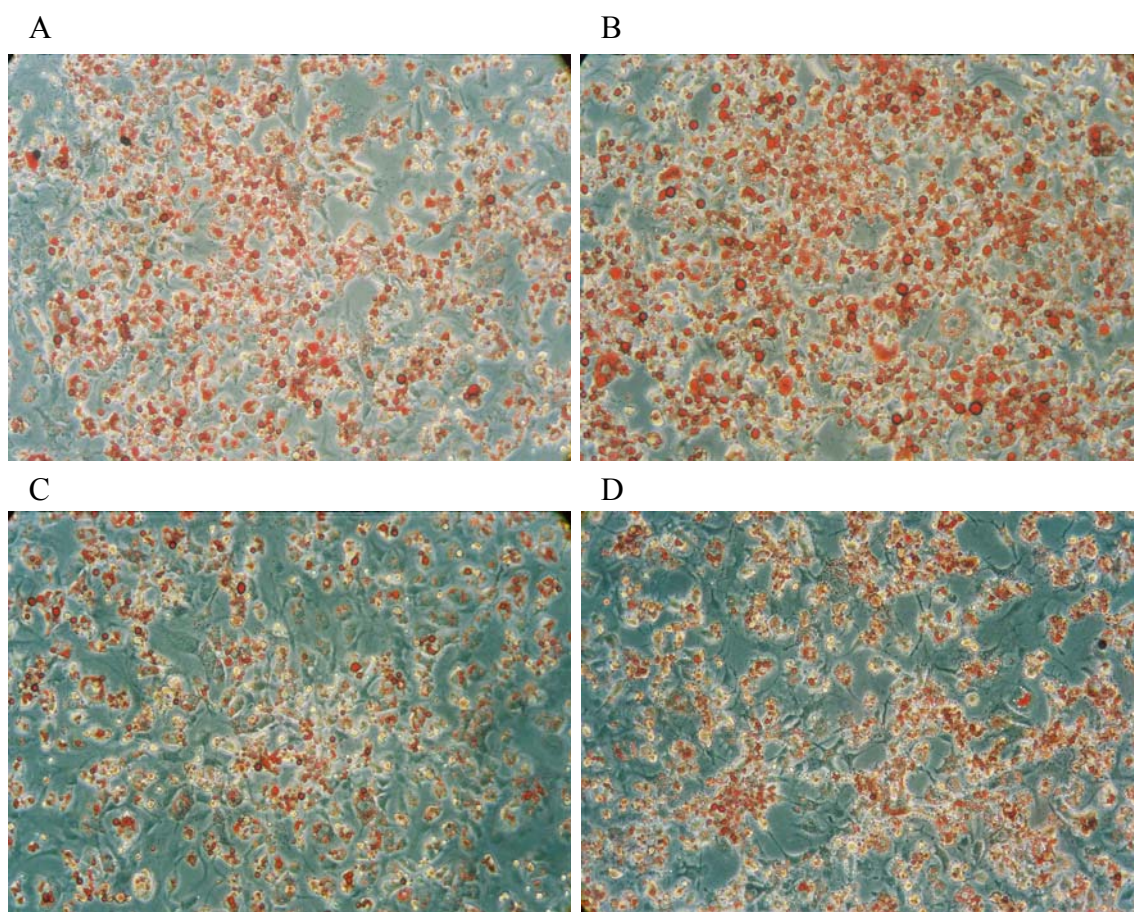


Fig. R3. Efectos de la metformina y la insulina sobre el proceso de diferenciación. El día 12 de la diferenciación (último día de tratamiento) se procedió a teñir las células con el oil red-O. A partir del día 7 se dejaron las células en medio de mantenimiento bajo 4 condiciones distintas: (A) Células sin tratar, (B) células tratadas con 1 μ M insulina, (C) células tratadas con 4 mM metformina, (D) células tratadas con 1 μ M insulina + 4 mM metformina.

2.2 LA METFORMINA INDUCE LA EXPRESIÓN DE UCP2 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN

A este punto se procedió a analizar los niveles de expresión de UCP2 en presencia de metformina. Para ello, el día 7 se trataron las células con 4 mM de metformina y 1 μ M de insulina y desde este día hasta el día 12 de diferenciación se prepararon los extractos ricos en mitocondrias. De estos extractos se analizaron los niveles de expresión de la proteína por western blot.

El resultado se muestra en la figura R4, B donde se observa que la expresión de UCP2 aumenta durante la diferenciación en presencia de metformina, obteniéndose un máximo de expresión el día 9. A partir de este día los niveles de la proteína disminuyen de forma gradual, aunque se mantienen más altos con respecto a las muestras control.

2.3 LA INDUCCIÓN DE LA UCP2 SE DEBE A LA METFORMINA Y NO A LA INSULINA

No obstante el efecto de la metformina sobre la expresión de UCP2 resultaba bastante claro, existía la incertidumbre sobre la posibilidad de que la presencia de la insulina en los tratamientos pudiera influir sobre dicho efecto. Por tanto, se analizaron por western blot los niveles de expresión de UCP2 a partir de 4 distintas condiciones de tratamiento: insulina 1 μ M, metformina 4 mM, metformina 4 mM + insulina 1 μ M y control.

Las muestras se analizaron los días 7,9 y 12 de diferenciación y los resultados se recogen en las figuras R4, C y D. En la C se muestra un western blot representativo, donde se aprecia una inducción de la expresión de UCP2 en las muestras tratadas con metformina y metformina + insulina con respecto a los niveles basales. Por el contrario, las muestras tratadas con insulina presentan niveles de expresión de UCP2 parecidos a los controles. De esto se deduce que la metformina induce la expresión de UCP2 independientemente de la presencia de la insulina durante los tratamientos.

En las figuras R4, D se observa que el día 9 los niveles de expresión de UCP2 presentan un incremento significativo de 2,5 veces en las muestras tratadas con metformina y de 3 veces en las muestras tratadas con metformina + insulina con respecto al control y a las muestras tratadas con insulina.

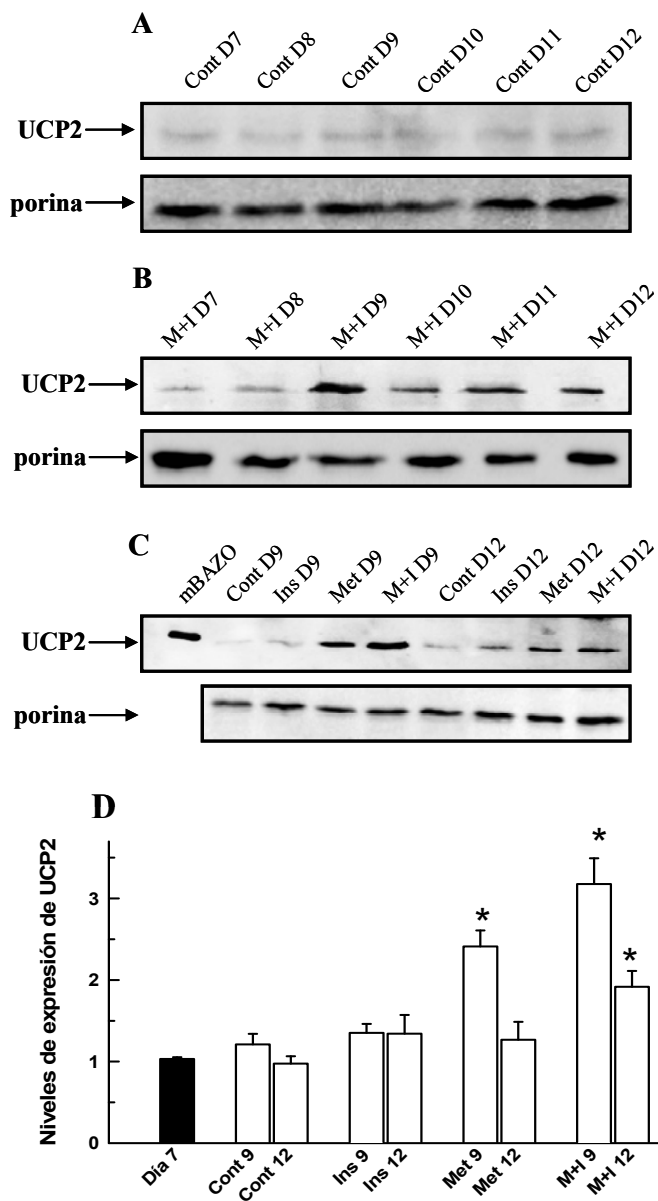


Fig. R4. La metformina induce la expresión de UCP2 durante el proceso de diferenciación. A partir del día 7 se dejaron las células en medio de mantenimiento bajo 4 condiciones distintas: Células sin tratar(Cont), células tratadas con 1 μ M insulina (Ins), células tratadas con 4mM metformina (Met), células tratadas con 1 μ M insulina + 4mM metformina (M+I). El “mBAZO” corresponde a las mitocondrias del bazo de ratón no tratado, en cuyo tejido la UCP2 se expresa de manera abundante. Del análisis por western blot se observó: **(A)** Niveles constantes de la expresión de UCP2 a lo largo de la diferenciación desde el día 7 hasta el día 12. **(B)** Incremento de los niveles de expresión de UCP2 inducido por M+I desde el día 8 hasta el día 12, con un máximo de inducción el día 9 de diferenciación. **(C)** Western blot representativo de los efectos de Cont, Ins, Met y M+I sobre la expresión de UCP2 los días 7,9 y 12. **(D)** Variaciones significativas de los niveles de expresión de UCP2. Las barras de error representan el error estándar medio (e.s.m.), que se obtuvieron a partir del

análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos se calcularon con respecto al control del mismo día. Los resultados obtenidos se normalizaron respecto a los niveles de expresión de la porina.

2.4 LA METFORMINA INDUCE LA EXPRESIÓN DE UCP2 *IN VIVO*

A este punto, se estudió el efecto de la metformina sobre la UCP2 en un modelo *in vivo*. Basandonos en el método descrito por Zou y colaboradores (Zou, Kirkpatrick et al. 2004), se suministró una dosis diaria de metformina durante 3 días a ratones macho C57/BL6 (ver apartado 2.1 de los materiales y métodos). A continuación, después de sacrificarlos, se prepararon extractos mitocondriales a partir del tejido adiposo blanco de la zona

epididimal, de músculo esquelético y de hígado. Estos extractos se analizaron por western blot, donde se observó que en el TAB la expresión de UCP2 aumentaba notablemente en presencia de metformina (Fig. R5, A), mientras que en músculo esquelético (Fig. R5, B) y en hígado (Fig. R5, C) no se detectó ninguna variación con respecto a los mismos tejidos de los ratones control.

De este dato se puede concluir que la metformina induce la expresión de UCP2, tanto *in vivo* como *in vitro*.

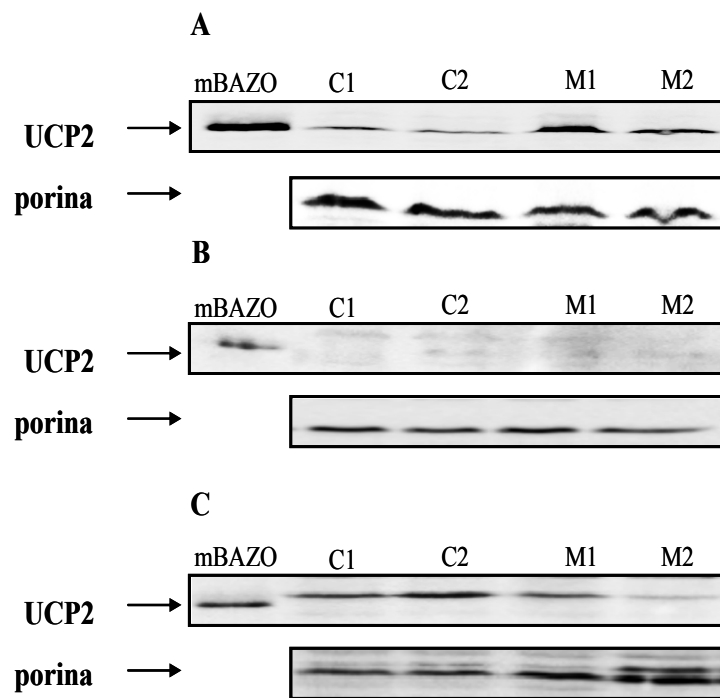


Fig. R5 La metformina induce la expresión de la proteína UCP2 en el tejido adiposo blanco *in vivo*. A partir de (A) mitocondrias aisladas de tejido adiposo blanco de ratón (B) mitocondrias aisladas de músculo esquelético de ratón (C) mitocondrias aisladas de hígado de ratón se analizaron los niveles de expresión de la UCP2 por western blot. C1 y C2 corresponden a los ratones no tratados o control, M1 y M2 corresponden a los ratones tratados con metformina (250mg/kg/día), mientras que mBAZO corresponde a las mitocondrias del bazo de ratón no tratado. Los resultados fueron normalizados respecto a los niveles de expresión de porina.

2.5 LA METFORMINA CAUSA ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA DIFERENCIACIÓN

A este punto, procedimos a realizar medidas de marcadores de estrés oxidativo para establecer si la UCP2 está inducida en condiciones de elevados niveles de ROS.

Para determinar si la metformina tiene la capacidad de inducir la formación de ROS en el adipocito, se abordó el estudio con dos distintos ensayos:

- Análisis de la producción de ROS por citometría de flujo
- Análisis de la actividad de la aconitasa por electroforesis

2.5.1 La metformina incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno

En primer lugar, se analizaron primero los niveles basales de ROS sin tratamiento. Para ello, desde el día 7 hasta el día 12 de diferenciación se prepararon las muestras para el ensayo de citometría de flujo tal y como se describe en el apartado 2.4.1 de los Materiales y Métodos. Utilizamos la rotenona a concentración de 8 μ M durante 2 horas como inductor de estrés oxidativo (control positivo) para tener una medida de referencia sobre la capacidad de generar ROS en nuestras condiciones experimentales. De los resultados obtenidos se observó que los niveles basales de ROS se mantienen constantes durante la diferenciación (Fig. R6, A).

A continuación, se analizaron los niveles de ROS en presencia de metformina. Para ello el día 7 se trataron las células con 4 mM de metformina y 1 μ M de insulina y, desde este día hasta el día 12 de diferenciación se prepararon las muestras para el ensayo de citometría de flujo

Los resultados se recogen en la figura R6, B y muestran que las ROS aumentan durante la diferenciación en presencia de metformina, obteniéndose un máximo de expresión el día 9. A partir de este día los niveles disminuyen de forma gradual, aunque se mantienen más altos con respecto a las muestras control.

También en este caso verificamos que el efecto observado dependía exclusivamente de la metformina. Para ello se trataron las células según 4 condiciones distintas: insulina 1 μ M, metformina 4 mM, metformina 4 mM e insulina 1 μ M y control.

Los días 7,9 y 12 de diferenciación, se analizaron las muestras por citometría de flujo. También en este caso se utilizó la rotenona como control positivo.

Como se observa de la figura R6, C, el día 9 los niveles de ROS presentan un incremento significativo de 1,85 veces en las muestras tratadas con metformina y de 1,75 veces en las muestras tratadas con metformina + insulina con respecto al control y a las muestras tratadas con insulina.

De este estudio cabe destacar que el aumento de ROS coincide con el incremento de los niveles de UCP2.

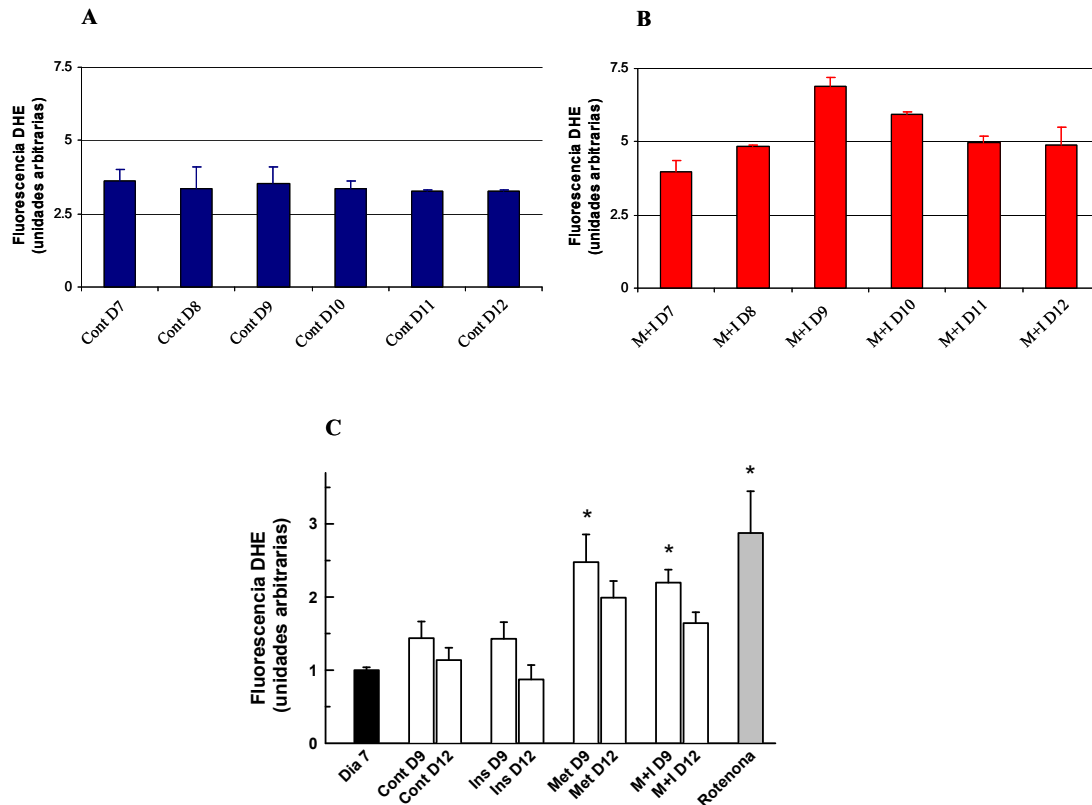


Fig. R6. La metformina aumenta los niveles de ROS intracelular durante el proceso de diferenciación. A partir del día 7 se dejaron las células en medio de mantenimiento bajo 4 condiciones distintas: Células sin tratar (Cont), células tratadas con $1\mu\text{M}$ insulina (Ins), células tratadas con 4mM metformina (Met), células tratadas con $1\mu\text{M}$ insulina + 4mM metformina (M+I). **(A)** Los niveles de ROS se mantienen constantes a lo largo de la diferenciación desde el día 7 hasta el día 12. **(B)** M+I provoca un incremento de los niveles de ROS durante la diferenciación, con un máximo de inducción el día 9. **(C)** Variaciones significativas de los niveles de ROS en los días 7, 9 y 12 de diferenciación. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos se calcularon con respecto al control del mismo día.

2.5.2 La metformina inhibe la actividad de la aconitasa

Paralelamente a los estudios sobre los niveles de ROS mediante citometría de flujo, se procedió a investigar cuál era la actividad de la enzima aconitasa en presencia de metformina. La aconitasa es una enzima extremadamente sensible a cambios en los niveles de anión superóxido. Un pequeño aumento de este anión es suficiente para inhibir drásticamente su actividad (Fridovich 1997; Tong, Jameson et al. 2003).

También en este caso, lo primero que se analizó fue la actividad basal de la aconitasa sin tratamiento. Se prepararon las muestras para el gel de electroforesis a partir de placas de adipocito en cultivo en fase de diferenciación. Se analizaron las muestras desde el día 7 hasta el día 12. Los resultados no mostraron ninguna variación en la actividad basal de la aconitasa (Fig. R7, A).

Una vez demostrado que estos niveles basales se mantenían constantes en nuestras condiciones, se analizó la actividad de la enzima en presencia de metformina. Para ello el día 7 se trataron las células con 4 mM de metformina y 1 μ M de insulina y, desde este día hasta el día 12 de diferenciación se prepararon las muestras para el análisis por electroforesis. En este caso se observó que su actividad disminuía claramente, obteniéndose una inhibición máxima el día 9 (Fig. R7, B).

Como en los ensayos anteriores, quisimos confirmar que el efecto observado dependía exclusivamente de la metformina. Para ello, se trataron los adipocitos según 4 condiciones distintas: insulina 1 μ M, metformina 4 mM, metformina 4 mM e insulina 1 μ M y control.

Los días 7, 9 y 12 de diferenciación, se analizaron los niveles de la actividad de la aconitasa por electroforesis. Al igual que en el ensayo de citometría se utilizó la rotenona 8 μ M durante 2 horas como control de la inhibición de la actividad de la aconitasa. En la figura R7, C se muestra un gel representativo donde se aprecia una inhibición de la actividad de la aconitasa en las muestras tratadas con metformina y metformina + insulina con respecto a las controles y a las tratadas con insulina, tanto el día 9 como el día 12 de diferenciación. En la misma figura R7, C, se demuestra que la actividad de la aconitasa presenta una disminución estadísticamente significativa estimada en un 50%.

De estos datos se concluye que la metformina genera estrés oxidativo en el adipocito blanco.

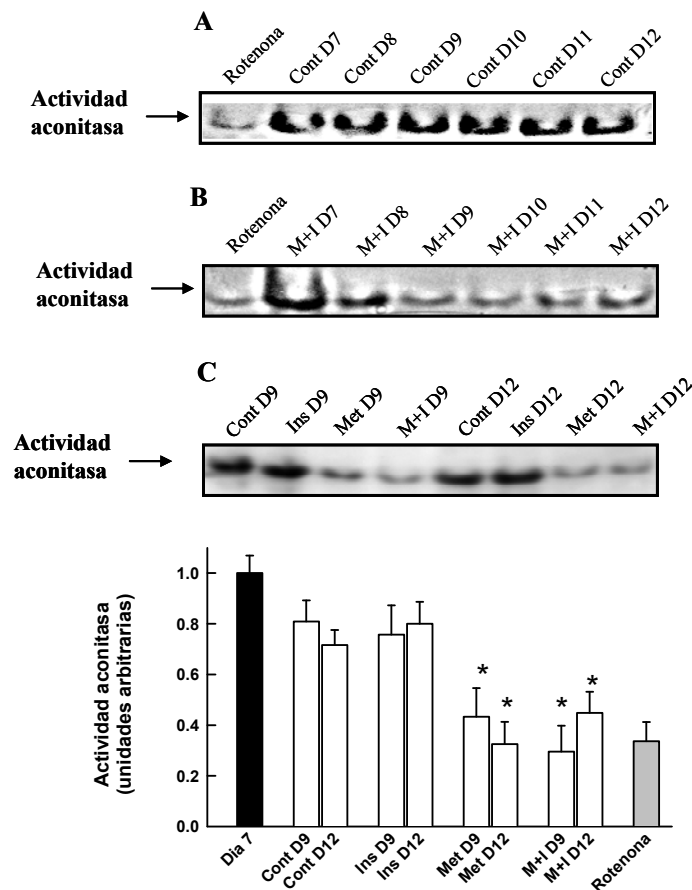


Fig. R7. La metformina inhibe la actividad de la aconitasa durante el proceso de diferenciación. A partir del día 7 se dejaron las células en medio de mantenimiento bajo 4 condiciones distintas: Células sin tratar(Cont), células tratadas con $1\mu\text{M}$ insulina (Ins), células tratadas con 4mM metformina (Met), células tratadas con $1\mu\text{M}$ insulina + 4mM metformina (M+I). (A) La actividad de la aconitasa resulta constante a lo largo de la diferenciación. (B) M+I provoca una drástica inhibición de la actividad de la aconitasa durante la diferenciación, con un máximo de inhibición el día 9. (C) Gel representativos y valoración estadística de las variaciones de la actividad de la aconitasa durante los días 7, 9 y 12 de diferenciación entre las distintas condiciones de tratamiento. Las barras

de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos se calcularon con respecto al control del mismo día.

2.6 LA METFORMINA ESTIMULA LA LIPOLISIS SÓLO AL FINAL DE LA DIFERENCIACIÓN

El siguiente objetivo fue definir el estado metabólico del adipocito en nuestras condiciones experimentales. Para ello, se procedió a investigar la actividad lipolítica de las células tratadas con metformina respecto a las células no tratadas.

Como en los ensayos anteriores, quisimos estudiar primero los niveles basales de lipólisis durante la diferenciación. Del día 7 hasta el día 12 se recogió cada día un pequeño volumen de medio de cultivo directamente de las placas. Una parte se utilizó para detectar la concentración de glicerol libre en el medio tal y como se describe en el apartado 2.5.1 de los Materiales y Métodos. De los resultados obtenidos se vio que, en este caso, los niveles basales de glicerol libre variaban a lo largo de la diferenciación. Exactamente dichos niveles aumentaban hasta el día 9 para luego mantenerse constantes. Por tanto, debido a que existía una estimulación basal de la lipólisis durante la diferenciación, decidimos efectuar directamente el análisis comparativo de los días 7, 9 y 12 entre los 4 grupos de estudio (control, insulina, metformina e metformina + insulina).

Dentro del rango de tiempo establecido se recogieron los sobrenadantes y se midió la cantidad de glicerol libre en cada muestra. Los ensayos realizados mostraron que en todas las muestras existía un incremento de la actividad lipolítica basal hasta el día 9. Sin embargo, mientras que las muestras control y las tratadas con insulina mantenían este nivel de lipólisis alcanzado el día 9 hasta el final de la diferenciación, las muestras tratadas con metformina y las tratadas con metformina e insulina seguían aumentando su actividad lipolítica hasta alcanzar un máximo el día 12. Es importante resaltar que en este caso las muestras tratadas con metformina mostraban una inducción de la lipólisis mayor que en las muestras tratadas con metformina e insulina. Esto significaba que probablemente la insulina estaba limitando el efecto lipolítico de la metformina (Fig. R8).

Estos datos nos sugirieron unas importantes conclusiones: el día 9 de diferenciación la lipólisis no se veía incrementada por la metformina. Sin embargo, la misma metformina inducía la expresión de UCP2 hasta alcanzar su nivel máximo el día 9. A partir del día 9 hasta el día 12 la metformina estimulaba la lipólisis, mientras los niveles de expresión de UCP2 disminuían gradualmente en este mismo tiempo. Por tanto estos resultados indicaban una aparente ausencia de correlación entre el aumento de la actividad lipolítica inducida por metformina durante la diferenciación y la inducción de UCP2. De manera análoga, esta conclusión fue deducible también comparando los datos de los niveles basales de la lipólisis con los niveles basales de la expresión de UCP2. Se puede apreciar que la expresión de la proteína resulta constante durante la diferenciación, mientras que la lipólisis presentaba un incremento de aproximadamente el doble desde el día 7 hasta el día 12.

Por tanto, de los resultados obtenidos hasta el momento, se concluye que la metformina induce la expresión de UCP2 durante la diferenciación y que la inducción coincide con el aumento de ROS. Por el contrario, la metformina no estimula la actividad lipolítica detectada en el adipocito, por tanto la inducción de UCP2 no está vinculada con este proceso.

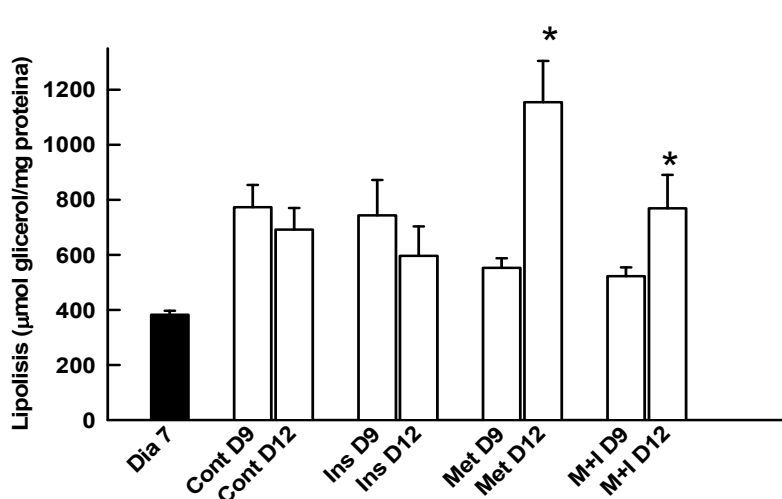


Fig. R8. La metformina induce lipólisis durante la diferenciación.

La concentración de glicerol liberado en el medio de cultivo se usó como índice de lipólisis. A partir del día 7 se dejaron las células en medio de mantenimiento bajo 4 condiciones distintas: Células sin tratar (Cont), células tratadas con 1 μM insulina (Ins), células tratadas con 4 mM metformina (Met), células tratadas con 1 μM insulina + 4 mM metformina (M+I). Se realizó un estudio comparativo entre las distintas condiciones

de tratamiento sobre las variaciones de la actividad lipolítica durante los días 7, 9 y 12 de diferenciación. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos se calcularon con respecto al control del mismo día.

PARTE 3

EFFECTOS DE LA METFORMINA EN EL ADIPOCITO MADURO

3.1 LA METFORMINA INDUCE LA EXPRESIÓN DE UCP2

Cabe señalar que los numerosos estudios publicados sobre la metformina reflejan que la concentración utilizada con más frecuencia durante los ensayos *in vitro* es de 1 mM. Con el fin de utilizar una concentración más baja de la que se utilizó en los ensayos anteriores (4 mM), se trataron los adipocitos el día 9 de diferenciación con las siguientes concentraciones de metformina: 0, 10 μM, 50 μM, 200 μM y 1 mM. El resultado se refleja en la figura R9, A, donde se demuestra que solamente a la concentración de 1 mM se detecta un incremento de la expresión de UCP2. Esta concentración es la que se adoptó para el desarrollo de la siguiente parte de este estudio.

Debido a que era interés del laboratorio verificar si en el adipocito blanco la metformina induce la expresión de la UCP2 rápidamente o si es necesario un tiempo más largo para poder observar este efecto, decidimos realizar nuestros ensayos en un tiempo comprendido entre 2 y 48 horas (2, 6, 15, 24 y 48 horas).

Así, una vez establecidos los parámetros del tiempo y de la concentración, nuestro siguiente objetivo fue tratar de determinar los efectos de la metformina en el adipocito maduro (el día 9 de diferenciación). Como primer ensayo se investigó el patrón de expresión de UCP2 en los adipocitos maduros tratados con metformina. El día 9 de

diferenciación se trataron las células con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas y, sucesivamente, se analizaron por western blot los niveles de expresión de UCP2. De la figura R9, B se observa que en todos los tiempos de tratamiento los niveles de UCP2 son más altos en las muestras tratadas con metformina con respecto al control. En la Figura R9, C se destaca que el aumento de la expresión de UCP2 es estadísticamente significativo a partir de las 2 horas de tratamiento, obteniéndose un máximo de inducción de casi el doble a las 24 horas con respecto al control del mismo día. Por tanto, estos resultados apuntan a que la UCP2 se induce rápidamente en respuesta a la metformina.

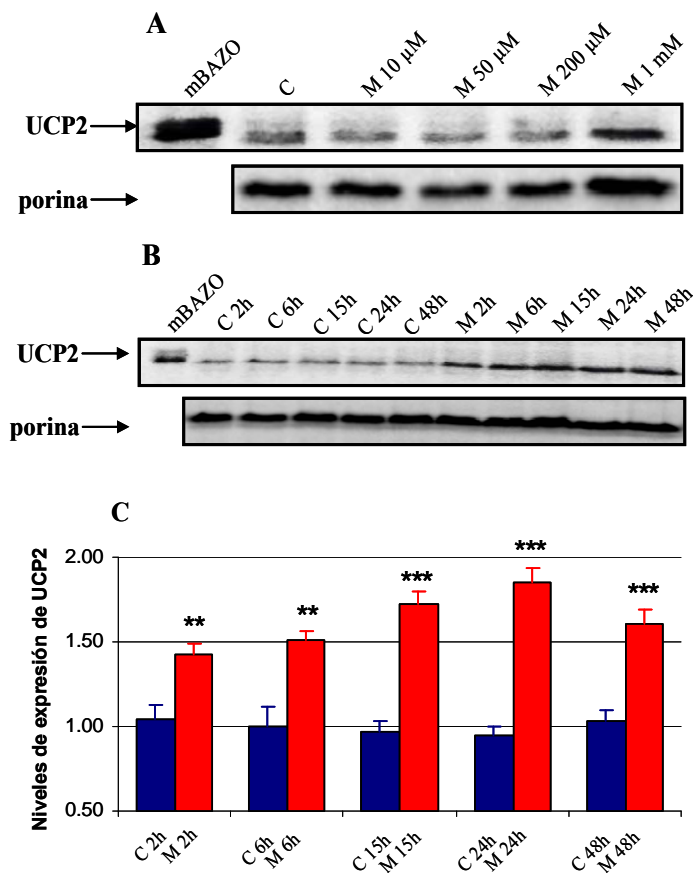


Fig. R9. La metformina induce la expresión de UCP2 en el adipocito maduro. (A) El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 24 horas: Células sin tratar(C), células tratadas con 10 µM metformina, células tratadas con 50 µM metformina, células tratadas con 200 µM metformina y células tratadas con 1 mM metformina. En este western blot representativo se observa que solamente las muestras tratadas con 1 mM metformina presentaban un aumento de la expresión de UCP2. (B) El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar(C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). En este western blot representativo se muestra que la metformina induce la expresión de UCP2 en todos los tiempos analizados.

(C) Diferencias significativas de los valores de expresión de UCP2 en los tiempos 2,6,15,24 y 48h entre células sin tratar(C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos de ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) se calcularon con respecto al control del mismo tiempo.

3.2 EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

Con el fin de determinar si el aumento de los niveles de expresión de UCP2 coincidía con una alteración del equilibrio redox en el adipocito maduro, se procedió a estudiar distintos marcadores de estrés oxidativo. Esta es la metodología que se empleó:

Estudio de la inducción de estrés oxidativo y apoptosis:

- Análisis de la producción de ROS por citometría de flujo.
- Análisis de la viabilidad celular y apoptosis por citometría de flujo.

Estudio de la activación del sistema antioxidante:

- Análisis de la actividad de la SOD
- Análisis de los niveles de glutatión oxidado frente la glutatión total.

3.2.1 La metformina incrementa la producción de especies reactivas del oxígeno

Para analizar por citometría de flujo los niveles de ROS intracelulares en el adipocito maduro, se trataron las células el día 9 de diferenciación con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas. Transcurrido este tiempo, se prepararon las muestras según descrito en el apartado 2.4.1 de los Materiales y Métodos y se incubaron con la sonda fluorescente DHE. La rotenona se usó como control positivo de estrés oxidativo a concentración de 8 μ M durante 2 horas.

Los resultados mostraron que en presencia de metformina la producción de ROS aumentaba significativamente a partir de las 2 horas de tratamiento. Además, este aumento era progresivo hasta las 24 horas, donde se alcanzó el doble de niveles de ROS con respecto al control (Fig. R10). A las 48 horas se produjo un ligero descenso, próximo a los valores detectados a las 15 horas.

De estos datos se dedujo que la inducción de la expresión de UCP2 coincidía con un aumento de la producción de ROS en el adipocito.

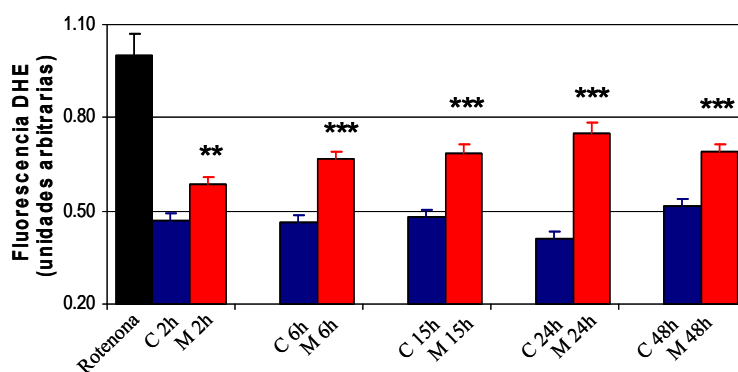


Fig. R10 La metformina provoca un aumento de los niveles de ROS en el adipocito maduro. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar(C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron

a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos de ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) se calcularon con respecto al control del mismo tiempo.

3.2.2 La metformina tiene un efecto apoptótico

La apoptosis es un complejo proceso de muerte celular programada, donde están implicados múltiples factores, entre los cuales las ROS. Está descrito que el estrés oxidativo provocado por un incremento de las ROS sea una importante señal para que se activen aquellas señales proapoptóticas como la formación del PTPm o la activación de las caspasas entre otras (Le Bras, Clement et al. 2005; Orrenius 2007).

Para comprobar si el estrés oxidativo generado por el tratamiento con la metformina podría estar provocando apoptosis en los adipocitos, se inició el estudio sobre el posible efecto apoptótico de la metformina en nuestras condiciones experimentales. El día 9 de diferenciación se trataron las células con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas. Las muestras se procesaron y se incubaron con 2 sondas fluorescentes al mismo tiempo, de las cuales una detecta la apoptosis temprana uniéndose a la fosfatidilserina presente en la cara externa de la membrana plasmática emitiendo fluorescencia verde (AnexinaV-Alexafluor 488 verde), mientras que la otra penetra en la célula y se une a la cromatina del núcleo emitiendo fluorescencia roja (ioduro de propidio), índice de necrosis celular (para más detalle ver el apartado 2.4.5 de los Materiales y Métodos). Las muestras previamente incubadas con estas 2 sondas se analizaron por citometría de flujo. En el ensayo se analizaron 4 poblaciones distintas:

- Area 1: población de adipocitos vivos o no apoptóticos (fluorescencia negativa)
- Area 2: población de adipocitos en apoptosis temprana (fluorescencia verde = AnexinaV positiva)
- Area 3: población de adipocitos en apoptosis tardía (fluorescencia verde = AnexinaV positiva y fluorescencia roja = ioduro de propidio positiva)
- Area 4: población de adipocitos en necrosis (fluorescencia roja = ioduro de propidio positiva)

En la figura R11, A se muestra el patrón de distribución de las sub-poblaciones a partir de las 15 horas de tratamiento. De esta figura se puede apreciar que a las 15 horas hay un incremento de la apoptosis temprana (area 2) en los adipocitos tratados con metformina respecto al control del mismo tiempo. Este incremento es levemente mayor en el tiempo de tratamiento de 24 horas, mientras que a las 48 horas de tratamiento se aprecia un notable incremento de la apoptosis temprana y también de la apoptosis tardía (area 3) en las muestras tratadas con metformina con respecto al control del mismo tiempo. En la figura R11, B se representan los cambios en la detección de la fluorescencia correspondiente a la Anexina V (apoptosis temprana). En este caso se señala el aumento paulatino de la apoptosis temprana desde las 15 horas hasta las 48 horas de tratamiento en

las muestras tratadas con metformina con respecto a las muestras control del mismo tiempo.

En la figura R11, D se demuestra que el aumento de la apoptosis temprana en las muestras tratadas con metformina es estadísticamente significativo. Este incremento corresponde al 20% a las 15 horas, del 25% a las 24 horas y del 35% a las 48 horas en presencia de metformina con respecto a los controles del mismo tiempo. En la figura R11, C se observa una disminución de células vivas en las muestras tratadas con metformina que corresponde al 20% a las 15 horas, del 30% a las 24 horas y del 35% a las 48 horas con respecto a los controles del mismo tiempo.

En resumen, se puede concluir que la metformina provoca apoptosis en los adipocitos maduros a partir de las 15 horas de tratamiento. Cabe resaltar que la disminución del total de células vivas (20-35%) corresponde exactamente al incremento de la tasa de apoptosis (20-35%) en los tiempos de tratamientos analizados.

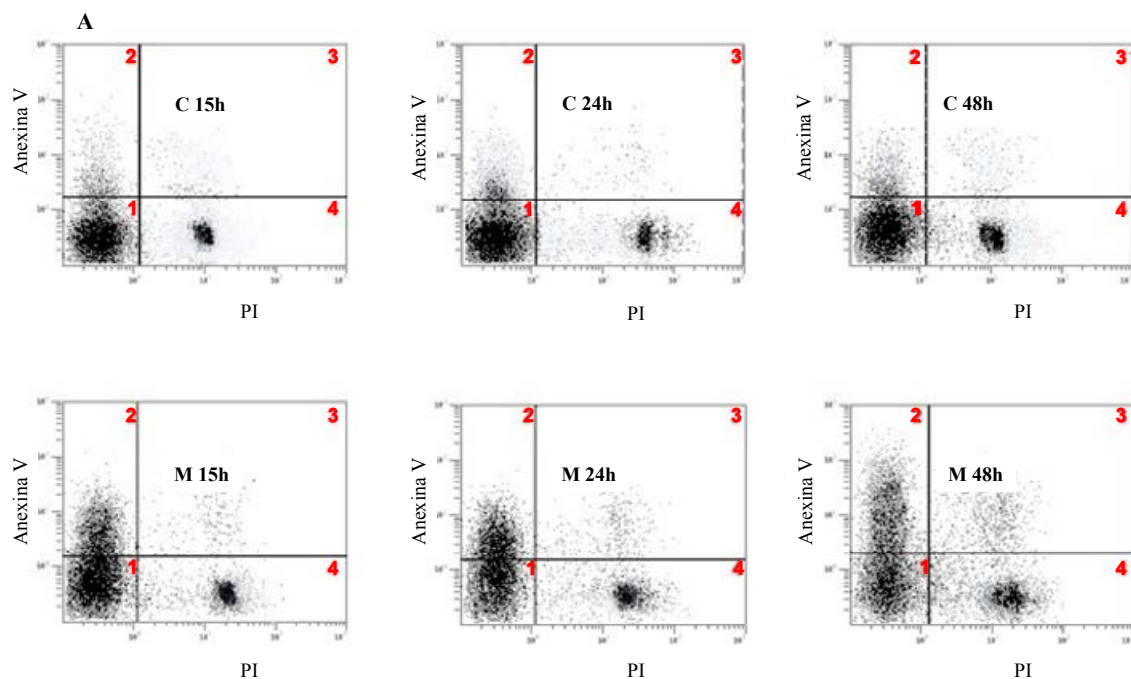


Fig. R11. La metformina induce apoptosis en el adipocito maduro. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar(C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). (A) Experimento representativo donde se muestra el aumento de la apoptosis en las muestras tratadas con metformina entre 15 y 48 horas de tratamiento.

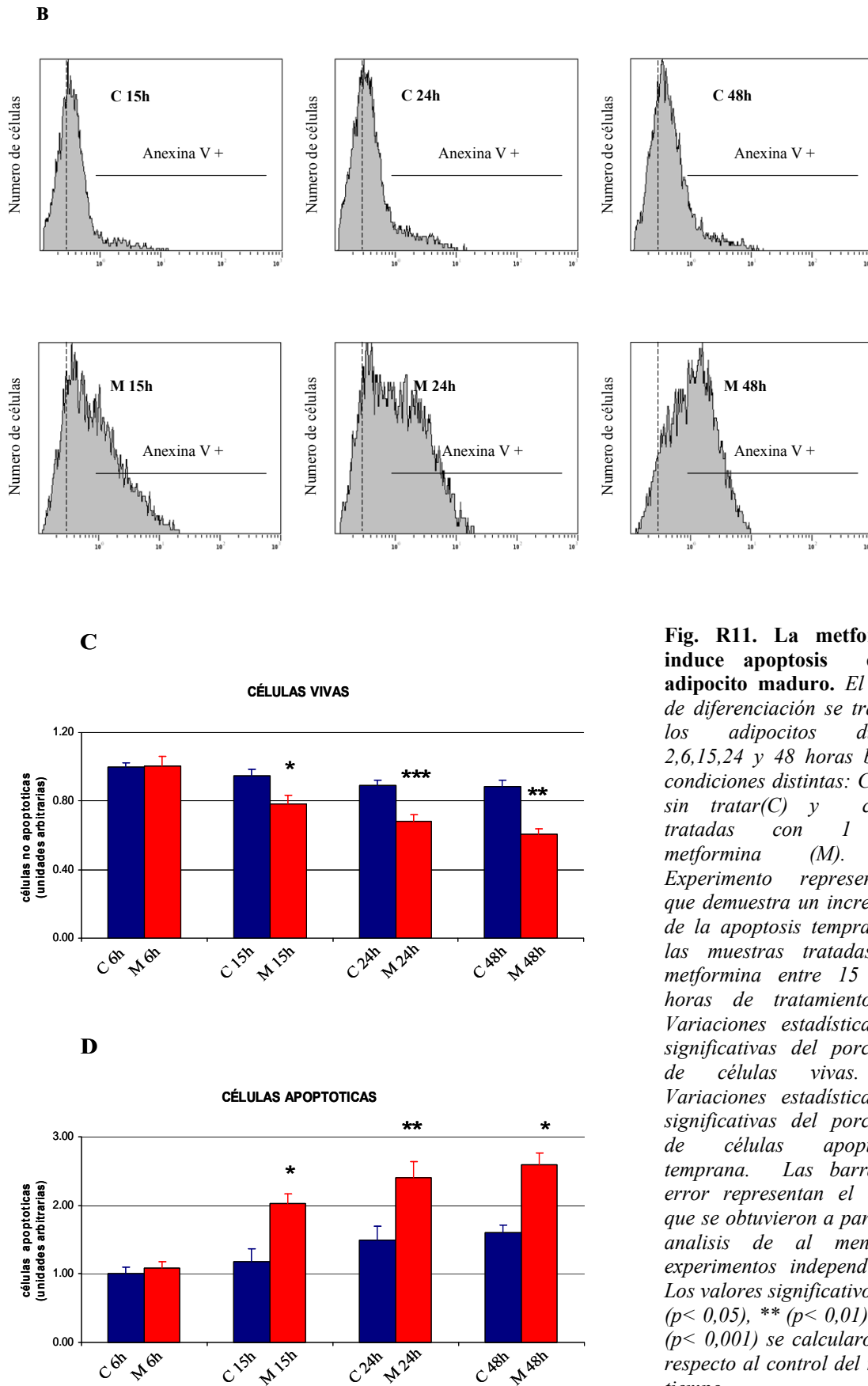


Fig. R11. La metformina induce apoptosis en el adipocito maduro. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar(C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). **(B)** Experimento representativo que demuestra un incremento de la apoptosis temprana en las muestras tratadas con metformina entre 15 y 48 horas de tratamiento **(C)** Variaciones estadísticamente significativas del porcentaje de células vivas. **(D)** Variaciones estadísticamente significativas del porcentaje de células apoptóticas temprana. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) se calcularon con respecto al control del mismo tiempo.

3.2.3 La metformina provoca un aumento de la actividad enzimática de la superóxido dismutasa

Una vez demostrado que la metformina era responsable de provocar estrés oxidativo en el adipocito, procedimos a estudiar si el sistema antioxidante se encontraba activado en respuesta a este estado redox alterado. En primer lugar se analizó la actividad de la enzima SOD como medida de la respuesta antioxidante de la célula.

El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas. A continuación se prepararon las muestras y se analizaron tal y como se describe en el apartado 2.4.3 de los Materiales y Métodos. Según los resultados que se reflejan en la figura R12, existe un aumento estadísticamente significativo de la actividad de esta enzima a partir de las 15 horas en las muestras tratadas con metformina respecto a las muestras no tratadas. Además, su actividad es máxima a las 24 y 48 horas donde alcanza el doble del valor detectado en las muestras control.

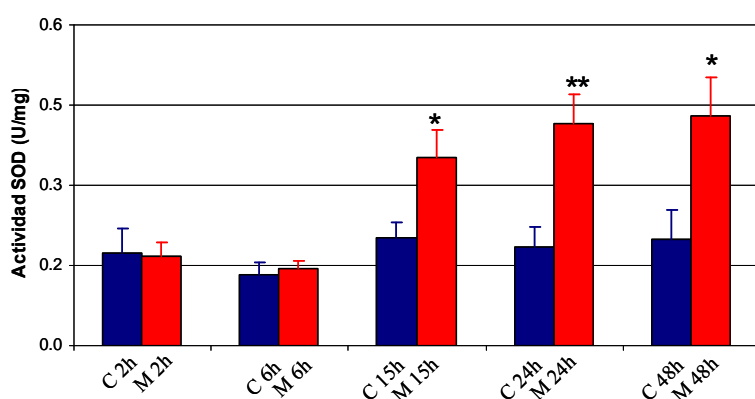


Fig. R12. La metformina provoca el aumento de la actividad de la SOD en el adipocito maduro. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,14,24 y 48 horas bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar (C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron

a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos de * ($p < 0,05$) y ** ($p < 0,01$) se calcularon con respecto al control del mismo tiempo.

3.2.4 La metformina aumenta la cantidad del glutatión oxidado

Para realizar el estudio comparativo sobre los niveles de glutatión oxidado frente al glutatión total celular (GSht), el día 9 se trataron los adipocitos con metformina 1 mM, durante 2,6,15,24 y 48 horas. Transcurrido este tiempo, se prepararon las muestras según las condiciones del ensayo reflejadas en el apartado 2.4.4 de los Materiales y Métodos.

La gráfica de la figura R13, A señala que las concentraciones de glutatión total se mantienen constantes entre las muestras tratadas y las muestras no tratadas. Sin embargo, de la gráfica de la figura R13, B se demuestra como los niveles de glutatión oxidado aumentan en las muestras tratadas con metformina con respecto a las muestras control. Este incremento tiene lugar tras aproximadamente dos horas, sin embargo alcanza valores

estadísticamente significativos solamente a las 24-48 horas de tratamiento. En estos tiempos el incremento es de más de 2 veces con respecto a las muestras control.

De los datos obtenidos sobre el estado redox del adipocito, resulta evidente que el aumento de la concentración de las ROS intracelulares provocado por la metformina activa, como cabía esperar, el sistema antioxidante.

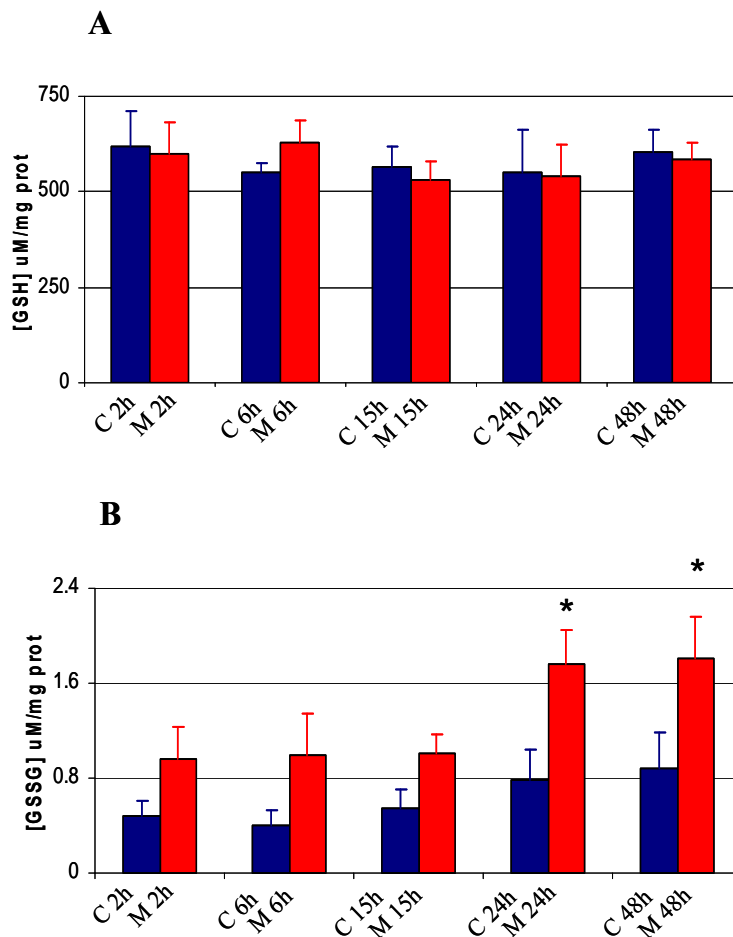


Fig. R13. La metformina provoca un aumento del glutatión oxidado en el adipocito maduro. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar(C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). (A) No se detectan variaciones significativas de la concentración de glutatión total en ambas condiciones. (B) En presencia de metformina se detecta una mayor concentración de glutatión oxidado que alcanza valores significativos a las 24 y 48 horas. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores se calcularon con respecto al control del mismo tiempo.

3.3 EFECTOS DE LA METFORMINA SOBRE EL METABOLISMO LIPÍDICO

El siguiente objetivo fue estudiar los efectos de la metformina sobre el metabolismo lipídico en el adipocito maduro. Para ello, se abordó el estudio de la siguiente forma:

Análisis de parámetros lipogénicos:

- Fosforilación de la enzima ACC
- Actividad de la enzima FAS

Análisis de parámetros lipolíticos:

- Actividad lipolítica
- β -Oxidación

3.3.1 La metformina inhibe la actividad de la enzima acetil CoA carboxilasa

La proteínquinasa ACC cataliza la síntesis del malonil-CoA a partir del acetil-CoA, que se considera el paso inicial de la síntesis de los ácidos grasos. La actividad de la ACC es regulada negativamente a través de un proceso de fosforilación catalizado por la AMPK (Zhou, Myers et al. 2001; Hawley, Gadalla et al. 2002). Así, el aumento de la fosforilación del ACC (p-ACC) se interpreta como una inhibición del proceso de síntesis de los ácidos grasos.

Con el fin de estudiar la actividad de este enzima tanto en condiciones basales como en presencia de metformina, el día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas. Al cabo de estos tiempos, se analizaron los niveles de ACC fosforilado por western blot.

Los resultados se recogen en la figura R14, A y B. En la A destaca el aumento de la cantidad de p-ACC en las muestras tratadas con metformina con respecto a las muestras control en todos los tiempos de tratamiento analizados. En la B se puede observar como este incremento de la fosforilación de la ACC adquiere valores significativos a partir de las 6 horas de tratamiento hasta detectarse el doble de p-ACC en las muestras tratadas con metformina entre 15 y 48 horas con respecto a las muestras control del mismo tiempo.

3.3.2 La metformina inhibe la actividad de la enzima ácido graso sintasa

Está descrito que la inhibición de la actividad de la ACC por fosforilación conlleva una inhibición de la actividad de la FAS (Hardie, Hawley et al. 2006). Para estudiar la actividad de esta enzima, el día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas. Transcurrido este tiempo, se prepararon las muestras y se analizaron según las condiciones del ensayo que se detallan en el apartado 2.4.2 de los Materiales y Métodos.

Los resultados presentes en la figura R14, C demuestran que, en las muestras tratadas con metformina, la actividad de la FAS presenta una inhibición estadísticamente significativa, estimada en un 15% a partir de las 15 horas de tratamiento. Esta inhibición crece paulatinamente, hasta alcanzar un valor del 25% durante las 24 y 48 horas de tratamiento con respecto a las muestras control del mismo tiempo.

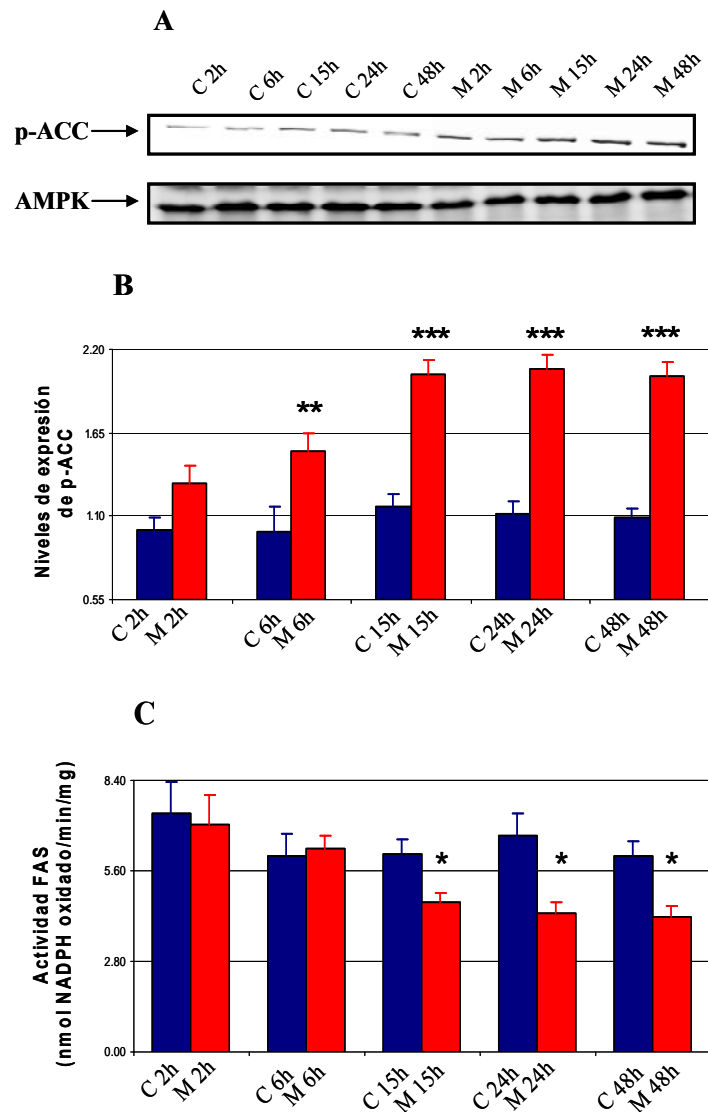


Fig. R14. La metformina inhibe la lipogénesis en el adipocito maduro. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar (C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). **(A)** Western blot representativo, donde se muestra que la cantidad de ACC fosforilado detectada es mayor en las muestras tratadas con metformina **(B)** El aumento de la fosforilación del p-ACC es estadísticamente significativo a partir de las 6 horas en las células tratadas con metformina **(C)** La actividad de la FAS disminuye en presencia de metformina hasta alcanzar niveles estadísticamente significativos a partir de las 15 horas de tratamiento. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) se calcularon con respecto al control del mismo tiempo.

3.3.3 La metformina no promueve una mayor oxidación de los ácidos grasos

Una vez demostrado que la metformina inhibe la lipogénesis, se procedió a caracterizar el catabolismo lipídico en nuestras condiciones experimentales. Primero investigamos el proceso de la β -oxidación en adipocitos maduros tratados con metformina y en adipocitos no tratados. Como índice de actividad oxidativa, se efectuaron medidas de consumo de oxígeno en el analizador XF24 en presencia de palmitato. Como descrito en el apartado 2.5.2 de los Materiales y Métodos, este analizador permite realizar el ensayo en condiciones más fisiológicas de las que consentían los electrodos de oxígeno convencionales. Mediante esta técnica, directamente a partir de células en cultivo (adherentes y en monocapa) es posible apreciar *in situ* pequeñas variaciones de consumo de oxígeno.

El día 7 de diferenciación, los adipocitos se plaquearon en placas XF de 24 pocillos específicas para este tipo de ensayo (90.000 células por pocillo). El día 9 se trataron con

metformina 1 mM durante 2,615,24 y 48 horas. 1 hora antes del ensayo los adipocitos se mantuvieron en el medio KHB (ver apartado 2.5.2 de los Materiales y Métodos). Este medio se define también mínimo dado que el único sustrato (la glucosa) se encuentra a una concentración baja, necesaria para la supervivencia de las células. En estas condiciones, al añadir el palmitato, se detecta un aumento del consumo de oxígeno que es proporcional a su oxidación.

En la figura R15, A se muestra un experimento representativo realizados con adipocitos control. Al principio se mide el consumo de oxígeno basal de las células. A continuación, se efectúa la primera adición de palmitato que provoca un incremento del consumo de oxígeno, que es proporcional a su oxidación. Este incremento indica un aumento de la velocidad de respiración que es mayor durante las primeras medidas que siguen a la adición del palmitato, mientras que posteriormente disminuye conforme se va agotando la concentración de palmitato disponible. La segunda adición de palmitato provoca exactamente el mismo efecto que la primera adición, es decir un aumento del consumo de oxígeno después de la adición para luego disminuir en el tiempo según la disponibilidad del sustrato. Las dos adiciones de palmitato nos informan sobre la capacidad que tienen las mitocondrias de los adipocitos blancos de oxidar ácidos grasos. Finalmente, se comprobó también la respiración en presencia del desacoplante FCCP. Este agente va a producir la disipación del gradiente de potencial electroquímico de membrana y, por tanto, nos va a dar una idea de la capacidad respiratoria máxima de las mitocondrias del adipocito. Como se aprecia, los valores de consumo de oxígeno son, como cabe esperar, más altos que en presencia de palmitato.

En la figura R15, B se compara la actividad respiratoria de los adipocitos control (color azul) con los adipocitos tratados con metformina (color naranja). Como se puede observar, la velocidad de respiración en respuesta a las 2 adiciones de palmitato y a la adición final del FCCP es parecida en ambos casos, lo que significa que la capacidad oxidativa es similar en ambas condiciones. La gráfica de la derecha es una ampliación de los primeros 90 minutos de la gráfica de la izquierda.

En la figura R15, C se determina que en presencia de palmitato, el consumo de oxígeno presenta valores similares entre los adipocitos tratados con metformina y los adipocitos control. Este dato nos indica que los adipocitos blancos tienen la misma capacidad oxidativa en ambas condiciones. Del análisis de la figura R15, D también se observa que no existen diferencias significativas en la capacidad respiratoria máxima en presencia de FCCP, entre los adipocitos tratados con metformina y los adipocitos control. En este caso los valores de consumo de oxígeno en presencia de FCCP alcanzan el doble de los valores registrados en presencia de palmitato.

Estos datos apuntan a que la metformina no es capaz de aumentar la oxidación de los ácidos grasos en el adipocito blanco.

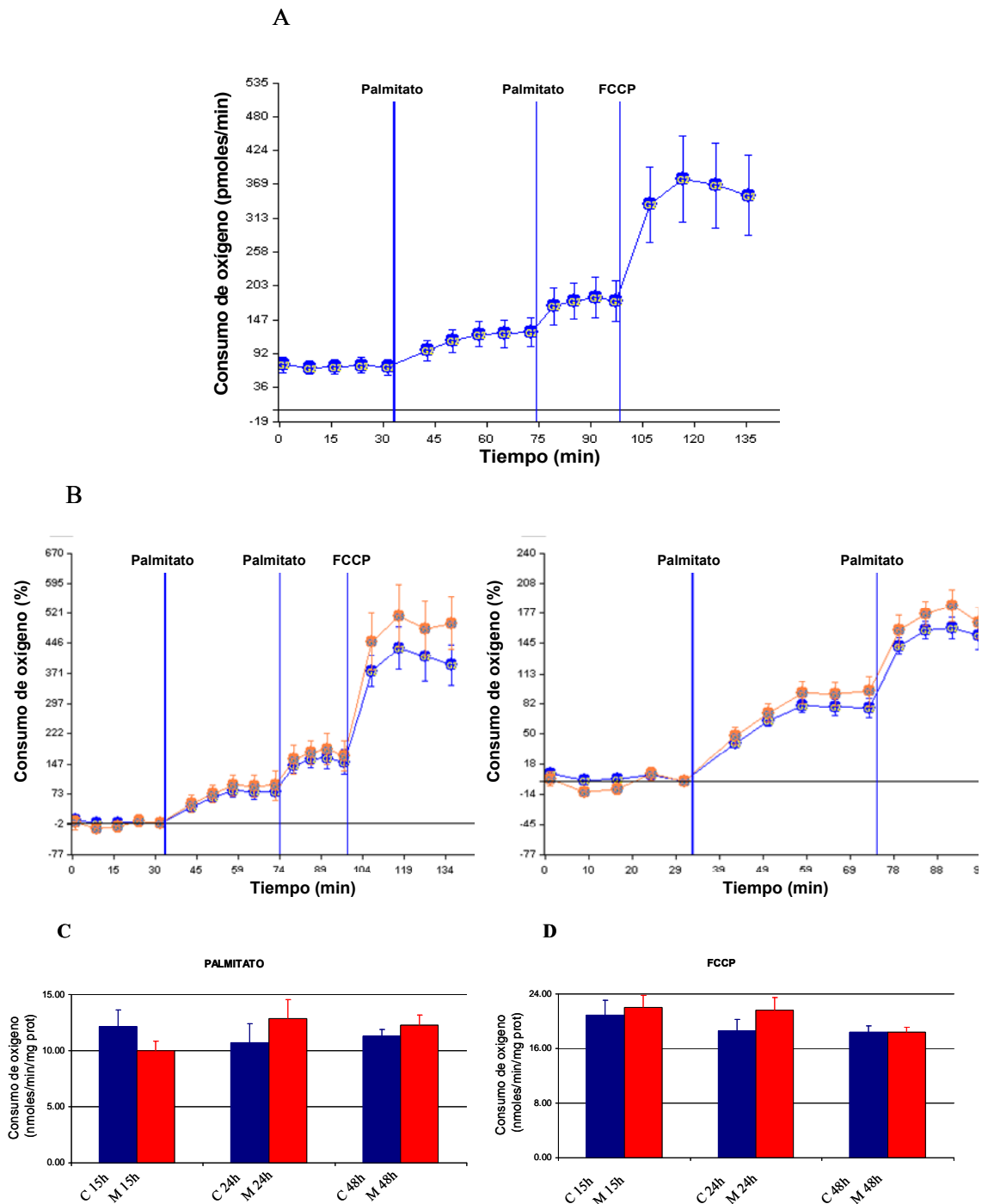


Fig. R15. No se detecta un aumento de la oxidación de los ácidos grasos en presencia de metformina en el adipocito maduro. El día 7 de diferenciación las células se plaquearon en las placas XF de 24 pocillos. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar (C) y células tratadas con 1 mM metformina (M) durante 2, 6, 15, 24 y 48 horas. **(A)** Experimento representativo del consumo de oxígeno en adipocitos control. **(B)** Experimento representativo que compara el consumo de oxígeno entre C y M. **(C)** No se detectan diferencias estadísticamente significativas entre C y M con palmitato como sustrato. **(D)** La capacidad máxima de respiración de las células en presencia de FCCP alcanza valores similares entre C y M. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes.

3.3.4 La metformina no estimula la lipólisis

Con el fin de completar nuestro estudio sobre el catabolismo lipídico, se determinó la actividad lipolítica del adipocito maduro tanto en condiciones basales como en presencia de metformina 1 mM. Para ello, el día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas. En cada tiempo, se recogieron los sobrenadantes y se midió la cantidad de glicerol libre según desrito en el apartado 2.5.1 de los Materiales y Métodos.

De los resultados obtenidos cabe destacar dos aspectos relevantes: tal y como se muestra en la figura R16 no hay cambios estadísticamente significativos entre la tasa lipolitica de las muestras control frente a las muestras tratadas con metformina. Además, se aprecia un incremento en la actividad lipolítica basal durante los tiempos analizados que alcanza un valor 5 veces mayor entre las 2 horas y las 48 horas.

Estos datos nos indican que en el adipocito blanco existe un aumento de la actividad lipolítica basal a lo largo del tiempo, que no se ve incrementada en presencia de metformina.

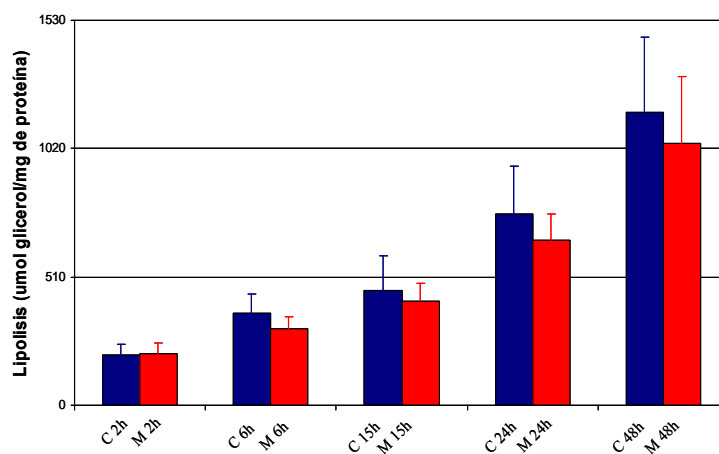


Fig. R16. No se detecta un aumento de la actividad lipolítica en presencia de metformina en el adipocito maduro. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar(C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del analisis de al menos 3 experimentos independientes.

3.4 EFECTOS DE LA METFORMINA SOBRE EL BALANCE ENERGÉTICO CELULAR

La AMPK es un importante regulador metabólico de la homeostasis energética en la célula. Su fosforilación comporta un incremento de su actividad en respuesta a una disminución del ATP celular, aunque se ha demostrado también que la AMPK puede ser activada por otros factores independientes de este cambio (Hawley, Pan et al. 2005; An, Wang et al. 2007). Debido a que se ha descrito que la metformina activa la AMPK en varios modelos celulares incluidos los adipocitos blancos (Daval, Foulle et al. 2006),

nuestro siguiente objetivo fue caracterizar el estado energético del adipocito en nuestras condiciones experimentales. Para ello se realizaron los siguientes ensayos:

- Análisis de los niveles de AMPK fosforilado (p-AMPK) por western blot
- Análisis de la concentración de ATP celular

3.4.1 La metformina promueve la activación de la AMPK.

El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas. Las muestras se prepararon en los tiempos de tratamientos marcados y, de cada una de ella, se analizaron sucesivamente los niveles de p-AMPK por western blot.

En la figura R17, A se puede observar un experimento representativo, donde las muestras tratadas con metformina presentan un incremento de los niveles de p-AMPK durante todos los tiempos analizados con respecto a las muestras control. Como se aprecia en la misma figura, utilizamos el AICAR como control positivo de fosforilación de la AMPK y el compuesto C inhibidor de su actividad, para comprobar la sensibilidad del anticuerpo utilizado frente a cambios de la fosforilación de la AMPK debido a estos agentes.

En la figura R17, B se determina que los niveles de p-AMPK aumentan de manera estadísticamente significativas a partir de las 2 horas de tratamiento con metformina, obteniéndose un incremento de más de 2 veces a las 24-48 horas con respecto a los controles del mismo tiempo.

Comparando estos datos con los datos sobre el metabolismo lipídico, se puede concluir que la activación de la AMPK coincide con la inhibición de la tasa lipogénica, pero no coincide con un aumento de la actividad lipolítica en el adipocito blanco.

3.4.2 La metformina provoca una disminución del ATP celular

Una vez establecido que la AMPK se activaba en nuestras condiciones experimentales, comprobamos si la activación de la AMPK respondía a cambios en la concentración del ATP celular.

Para ello, el día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas. Las placas se recogieron en los tiempos de tratamientos establecidos y después se procedió a preparar las muestras siguiendo las condiciones específicas del ensayo según se refleja en el apartado 2.4.3 de los Materiales y Métodos.

De los resultados mostrados en la figura R17, C se señala que los niveles de ATP celular bajan en las muestras tratadas con metformina con respecto a las muestras control, pero solamente a las 24 horas estas diferencias adquieren un valor estadísticamente significativo.

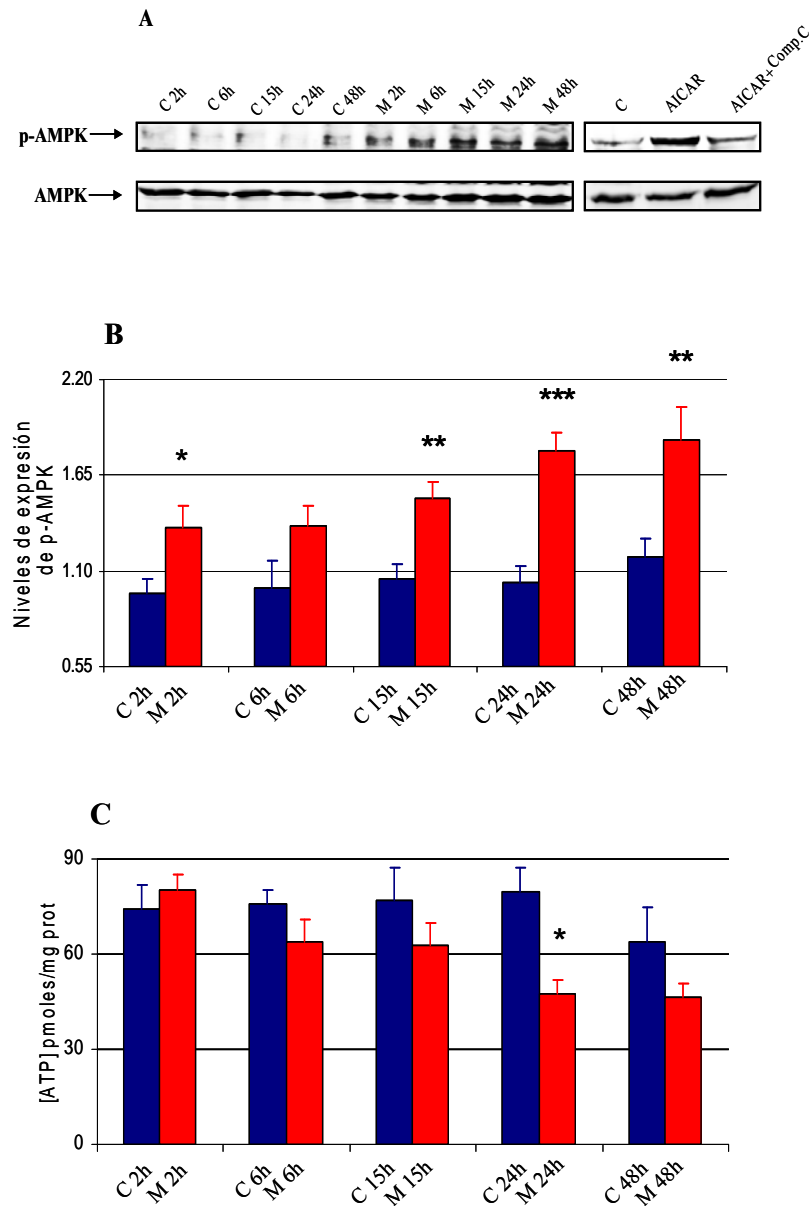


Fig. R17. La metformina estimula la activación de la AMPK y disminuye la concentración del ATP celular en el adipocito maduro. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar (C) y células tratadas con 1 mM metformina (M). **(A)** Western blot representativo donde se muestra que la cantidad de AMPK fosforilado detectada es mayor en las muestras tratadas con metformina durante todos los tiempos analizados **(B)** Los incrementos de la p-AMPK son estadísticamente significativos a partir de las 2 horas. **(C)** El ATP celular disminuye en presencia de metformina hasta alcanzar diferencias estadísticamente significativas a las 24 horas de tratamiento. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) se calcularon con respecto al control del mismo tiempo.

PARTE 4

PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA METFORMINA

4.1 IMPORTANCIA DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA ACTIVACIÓN DE LA AMPK Y LA INDUCCIÓN DE LA UCP2

Algunos trabajos presentes en la bibliografía han demostrado que la AMPK puede ser activada por las ROS. En concreto, An y su grupo, utilizando como modelo celular la línea adipocitaria 3T3-L1, demostraron que el peroxinitrito es una señal clave para que aumente la fosforilación de la AMPK (An, Wang et al. 2007). Del mismo modo, otros autores han observado una activación de la AMPK en condiciones de estrés oxidativo (Zou, Kirkpatrick et al. 2004).

Nuestros resultados habían evidenciado que la activación de la AMPK coincide con el aumento de ROS. Además, también la proteína UCP2 se encuentra inducida en este contexto. Así, con el fin de esclarecer si las ROS eran la señal activadora para las dos proteínas o dependían de señales independientes se procedió a diseñar el ensayo que a continuación se detalla.

Como punto de partida se trataron los adipocitos maduros con un agente antioxidante para que se eliminara el exceso de ROS producido por la metformina. En estas condiciones se analizaron:

- Niveles de expresión de UCP2 por western blot
- Niveles de AMPK fosforilada por western blot

4.1.1 El tiron reduce el efecto de la metformina sobre la generación de especies reactivas del oxígeno

Para la realización de este estudio se utilizó el agente antioxidante llamado tiron. Este compuesto es un análogo de la MnSOD, por tanto sus efectos son evitar el acúmulo de anión superóxido en la mitocondria. Con el fin de verificar la eficacia antioxidante del tiron en nuestras condiciones experimentales, el día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos según tres condiciones distintas: células sin tratar, células tratadas con 1 mM metformina y células tratadas con 1 mM metformina + 1 mM tiron. El tiron se añadió 30 minutos antes de los tratamientos con metformina y se retiró antes de añadir la metformina a los cultivos. En el rango de tiempo comprendido entre 2 y 48 horas (2,6,15,24 y 48 horas) se incubaron las muestras con la sonda fluorescente DHE y se analizaron por citometría de flujo.

El resultado se recoge en la figura R18, donde se demuestra que el tiron consigue disminuir el exceso de ROS generado por la metformina, aunque su eficacia parece reducirse a lo largo del tiempo. No obstante, las diferencias entre los niveles de ROS en presencia de metformina con respecto a los niveles de ROS en presencia de metformina y tiron del mismo tiempo son estadísticamente significativas entre las 6 y 24 horas de tratamiento.

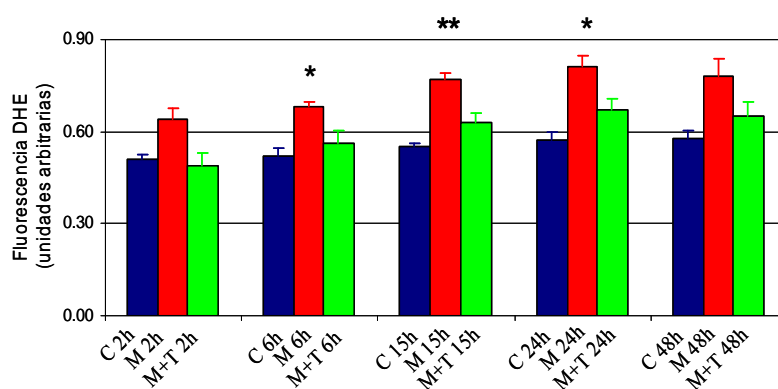


Fig. R18. El estrés oxidativo provocado por la metformina es reducido por el tiron en el adipocito maduro. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 3 condiciones distintas: Células sin tratar(C), células tratadas con 1 mM metformina (M) y células tratadas con metformina 1 mM y + tiron 1 mM (M+T). Las

disminuciones de los niveles de ROS debidas al efecto del tiron son estadísticamente significativas entre las 6 y 24 horas de tratamiento. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos de * ($p < 0,05$) y ** ($p < 0,01$) se calcularon entre las muestras M y M+T del mismo tiempo.

4.1.2 El tiron inhibe la inducción de UCP2 promovida por la metformina

Una vez demostrado que el tiron reduce las ROS generadas por la metformina en nuestras condiciones experimentales, quisimos verificar si la inducción de la expresión de UCP2 variaba en presencia de este agente. Así se procedió a estudiar por western blot los niveles de UCP2.

El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas según tres condiciones distintas: células sin tratar, células tratadas con 1 mM metformina y células tratadas con 1 mM metformina y 100 mM tiron. Las células se lisaron y se prepararon extractos ricos en mitocondrias para analizar los niveles de UCP2 por western blot.

Los resultados se muestran en las figuras R19, B y D. En la B se muestra un experimento representativo, donde se aprecia que el tiron disminuye la expresión de UCP2 inducida por metformina. Estas observaciones son respaldadas por la figura D en que se demuestra que las diferencias de expresión de UCP2 entre las muestras tratadas con metformina y las tratadas con metformina + tiron son estadísticamente significativas en todos los tiempos analizados.

De estos datos se concluye que la inducción de la UCP2 se debe al aumento de ROS provocado por la metformina.

4.1.3 El tiron no influye sobre la activación de la AMPK

Por último, se analizó el efecto del tiron sobre la fosforilación de la AMPK promovida por la metformina. Basandonos en los resultados anteriores, donde se demostró que la fosforilación de la AMPK implica necesariamente la fosforilación del ACC, decidimos estudiar los niveles de p-ACC intracelular porque el anticuerpo para el p-ACC es más específico y garantiza una resolución mejor que el anticuerpo de p-AMPK en las condiciones experimentales empleadas.

El día 9 se de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas según tres condiciones distintas: células sin tratar, células tratadas con 1 mM metformina y células tratadas con 1 mM metformina y 100 mM tiron. Las células se lisaron y se prepararon los extractos celulares totales para analizar los niveles de p-ACC por western blot.

Los datos se recogen en las figuras R19, A y C. En la A se refleja claramente que la activación de la ACC detectada en las muestras tratadas con metformina no se encuentra modificada por el tiron. Este resultado se confirma en la figura C, donde se demuestra que no existen diferencias significativas de los niveles de p-ACC en los tiempos analizados entre las muestras tratadas con metformina y metformina + tiron.

La interpretación de estos resultados nos llevó a la conclusión de que las ROS son una señal imprescindible para la inducción de UCP2 pero no para la AMPK.

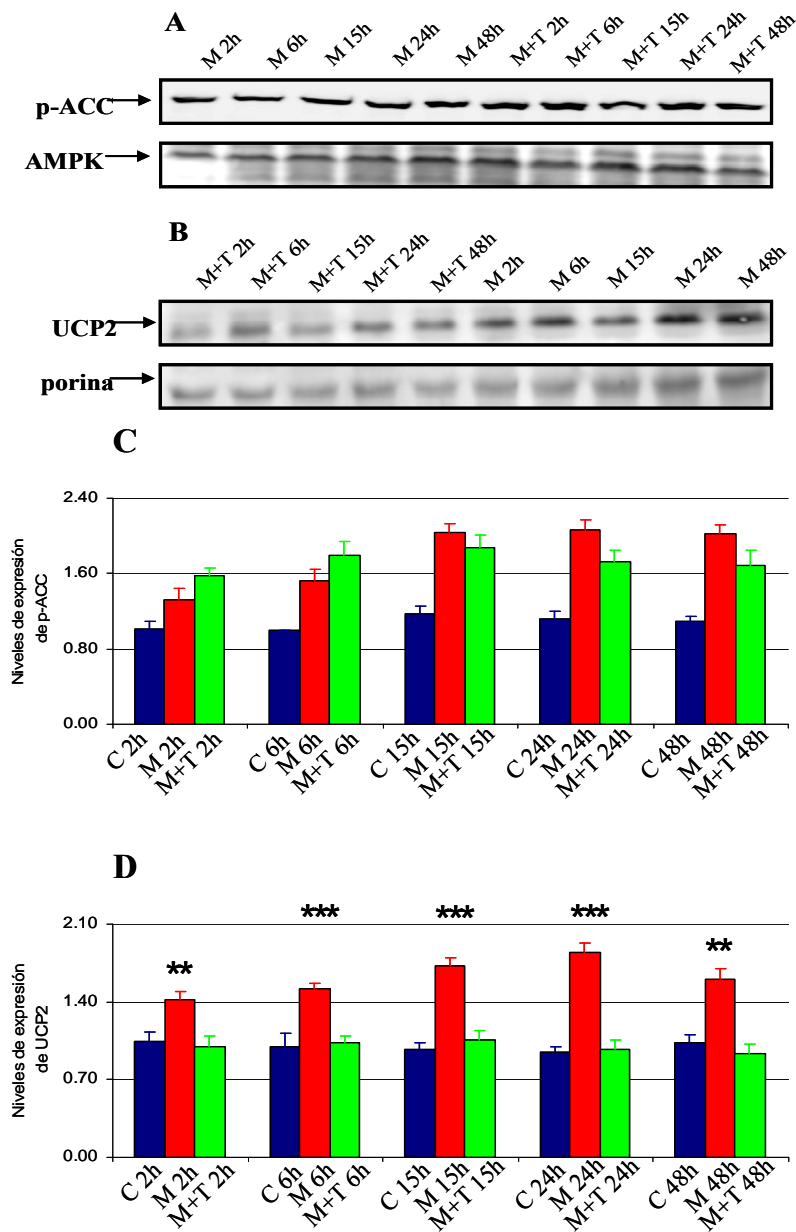


Fig. R19. El tiron reduce la expresión de UCP2 inducida por la metformina, pero no modifica la activación del ACC por metformina. Tanto para el estudio sobre los niveles de p-ACC en presencia del tiron, como para el estudio sobre los niveles de UCP2 en presencia del tiron, el día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos durante 2,6,15,24 y 48 horas bajo 3 condiciones distintas: Células sin tratar(C), células tratadas con 1 mM metformina (M) y células tratadas con metformina 1 mM y + tiron 1 mM (M+T). **(A)** Del análisis de los niveles de la proteína ACC por western blot fue posible observar que en todos los tiempos de tratamiento los niveles de p-ACC se mantienen constantes tanto en las muestras M como en las muestras M+T. **(B)** Del análisis de los niveles de la proteína UCP2 por western blot fue posible observar que, en todos los tiempos de tratamiento, el tiron consigue inhibir la inducción de UCP2. **(C)** Las variaciones de los niveles de pACC entre los distintos tratamientos no son significativas. **(D)** Las variaciones de los niveles de UCP2 son estadísticamente significativas en todos los tiempos analizados. Las

barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes. Los valores significativos de ** ($p < 0,01$) y *** ($p < 0,001$) se calcularon entre las muestras M y M+T del mismo tiempo.

PARTE 5

ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA METFORMINA

5.1 EFECTO DE LA METFORMINA SOBRE LA RESPIRACIÓN MITOCONDRIAL

Decidimos enfocar la última parte de la tesis en tratar de aclarar el mecanismo de acción de la metformina, por el cual se estimula la producción de ROS.

Está ampliamente demostrado que la metformina inhibe levemente la actividad del complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, provocando una disminución de la velocidad de respiración (Owen, Doran et al. 2000; Brunmair, Staniek et al. 2004). Por este motivo, se procedió a estudiar su efecto sobre la respiración mitocondrial en nuestras condiciones experimentales.

Utilizamos el analizador XF24 para medir consumo de oxígeno en adipocitos maduros. El día 7 de diferenciación los adipocitos se plaquearon en unas placas XF de 24 pocillo específicas para este tipo de ensayo (90.000 células por pocillo). El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos con metformina 1 mM durante 2,6,15,24 y 48 horas. Una hora antes del ensayo los adipocitos se mantuvieron en el medio DMEM sin bicarbonato tal y como descrito en el apartado 2.5.1 de los Materiales y Métodos.

En la figura R20, A se muestra un experimento representativo realizado con adipocitos control. En esta gráfica se observa que primero se mide el valor de la respiración basal. Tras la adición de la oligomicina se produce una disminución del consumo de oxígeno debido a la inhibición de la ATPasa. En este caso los valores de respiración representan el flujo de protones que regresan a la matriz a través de la membrana interna mitocondrial. La adición del FCCP provoca la disipación del gradiente de potencial electroquímico de protones y estimula así la respiración hasta su nivel máximo. Finalmente, la adición conjunta de la rotenona y la antimicina A causa una drástica reducción del consumo de oxígeno que representa la máxima inhibición de la respiración.

En la figura R20, B se muestra un experimento representativo donde se observan las diferencias en la tasa respiratoria entre los adipocitos control (rojo) y los adipocitos tratados con metformina (azul). La parte derecha de la figura representa una parte ampliada de la imagen de la izquierda y nos ayuda a observar claramente que el consumo de oxígeno basal es menor en las muestras tratadas con metformina. De este dato se deduce que la respiración está inhibida en presencia de metformina. Al añadir la oligomicina, el consumo de oxígeno se reduce más en las muestras control que en las tratadas. Tras la adición del FCCP, se detecta que, curiosamente, la capacidad respiratoria máxima es similar en ambas condiciones. La última adición de rotenona y antimicina A provoca la misma inhibición de la respiración.

Estos datos son respaldados por el análisis estadístico que se presenta en la figura R20, C, D y E. En la C se aprecia que en presencia de metformina el consumo de oxígeno es netamente menor que en los adipocitos control durante todos los tiempos analizados. Como se observa en la figura D, los porcentajes de inhibición se estiman entre 65 y 75%.

En la figura E se determinó que la capacidad respiratoria máxima inducida por el FCCP no presentaba diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos.

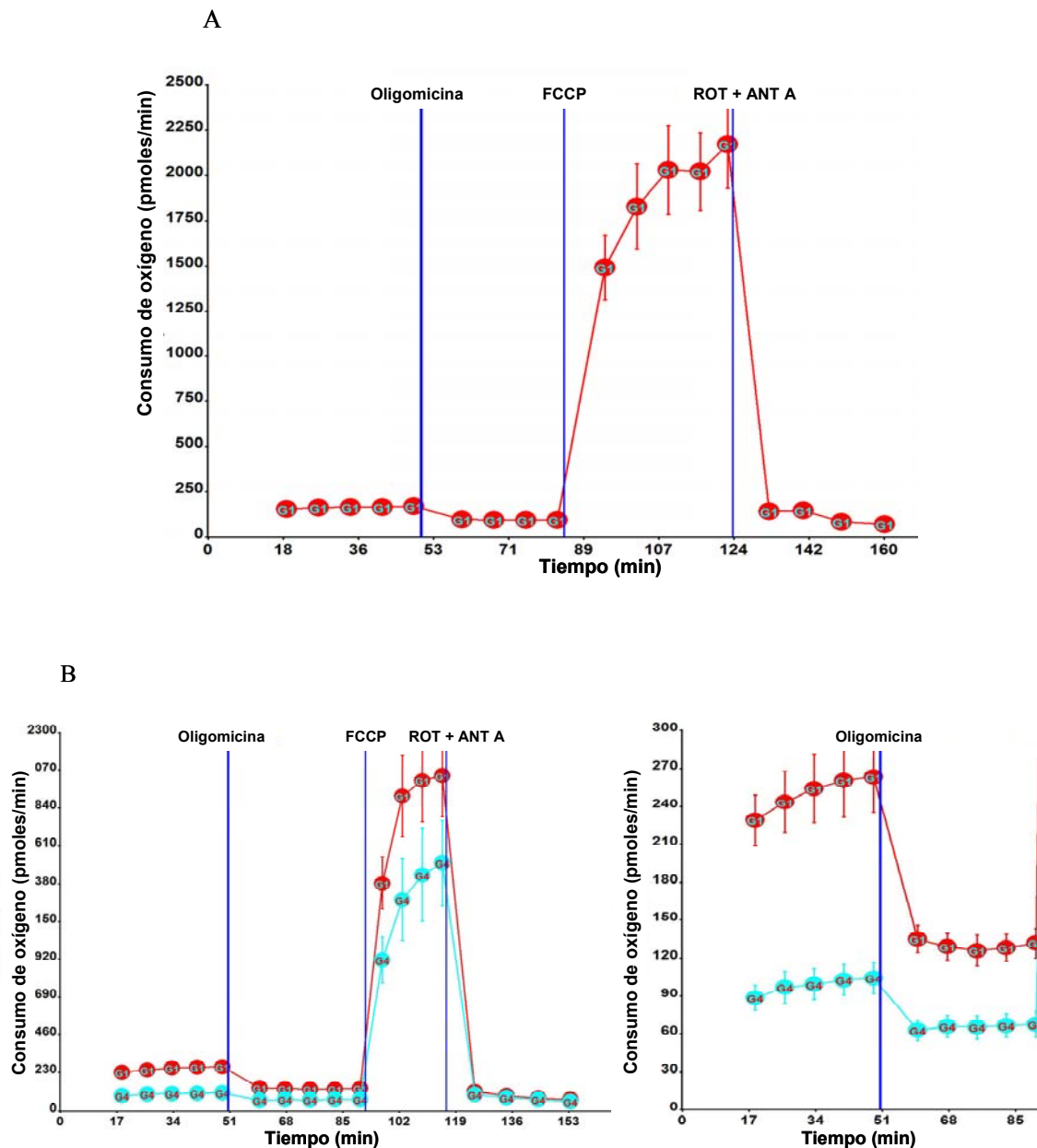


Fig. R20. La metformina inhibe la respiración mitocondrial en el adipocito maduro. El día 7 de diferenciación las células se plaquearon en las placas XF de 24 pocillos. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar (C) y células tratadas con 1 mM metformina (M) durante 2, 6, 15, 24 y 48 horas. (A) Experimento representativo del consumo de oxígeno en los adipocitos control. (B) Experimento representativo donde se aprecia que la metformina inhibe la respiración mitocondrial.

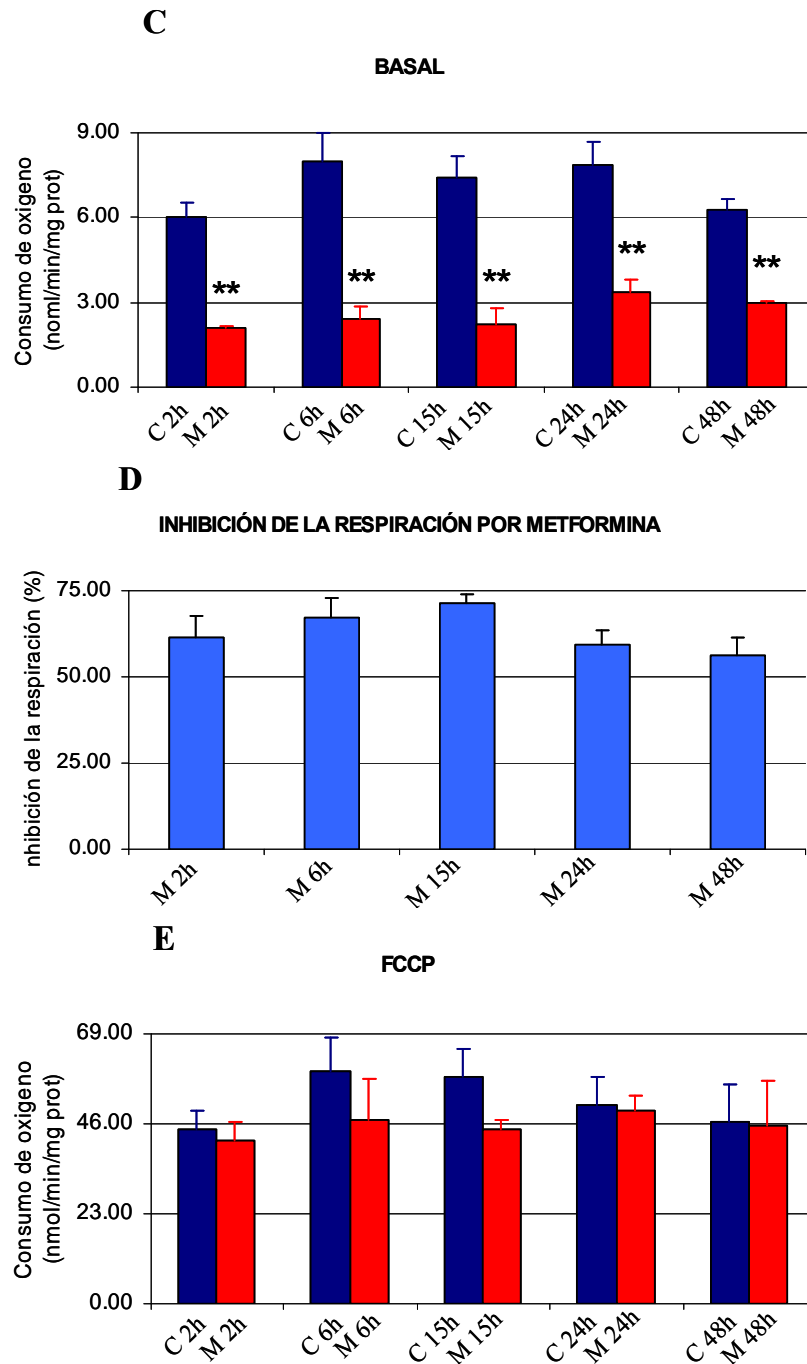


Fig. R20. La metformina inhibe la respiración mitocondrial en el adipocito maduro. El día 7 de diferenciación las células se plaquearon en las placas XF de 24 pocillos. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos bajo 2 condiciones distintas: Células sin tratar(C) y células tratadas con 1 mM metformina (M) durante 2,6,15,24 y 48 horas. **(C)** La tasa del consumo de oxígeno presenta una disminución estadísticamente significativa en las muestras tratadas con metformina, con respecto a los controles en todos los tiempos de tratamiento. **(D)** La inhibición de la respiración causada por metformina alcanza valores próximos al 65-75% en los tiempos de tratamiento analizados. **(E)** La capacidad máxima de respiración de las células en presencia de FCCP no presenta diferencias estadísticamente significativas entre C y M. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes.

5.1.1 Comparación del efecto inhibitor de la metformina y de la rotenona sobre la respiración mitocondrial

Los resultados obtenidos sobre el mecanismo de acción de la metformina nos impulsaron a estudiar más en detalle como se producía la inhibición de la respiración mitocondrial en nuestras condiciones. Quisimos efectuar un seguimiento del efecto de la metformina en función del tiempo, tratando los adipocitos directamente *in situ*. Es decir, con el analizador XF24 se puede suministrar la metformina a través de los inyectores y seguir desde ese mismo momento (tiempo 0) el consumo de oxígeno en el tiempo. Este efecto se comparó con la inhibición de la respiración causada por la rotenona. Se eligió una concentración baja (4 nM) de este agente porque queríamos obtener un efecto inhibitor parecido a la metformina.

Por tanto, procedimos a preparar el ensayo, en el cual el día 7 de diferenciación los adipocitos se plaquearon en unas placas XF de 24 pocillo específicas para este tipo de ensayo (90.000 células por pocillo). El día 9 de diferenciación se procedió a medir el consumo de oxígeno en los pocillo de la placa de ensayo. Después de haber efectuados las primeras medidas del consumo de oxígeno basal, se suministró *in situ* a un tercio de los pocillos la metformina a una concentración de 1 mM, a otro tercio la rotenona 4 nM, mientras que el ultimo tercio se consideraron los pocillos control. A partir de este momento se efectuaron lecturas de consumo de oxígeno cada 10 minutos durante 2 horas.

Los resultados que se detallan en la figura R21 evidenciaron que tanto en las muestras tratadas con rotenona, como en las muestras tratadas con metformina la cinética de inhibición de la respiración era gradual y constante con respecto a los adipocitos control. Sin embargo, en presencia de metformina la disminución de la velocidad de la respiración era detectable a partir de los 30-40 minutos, donde ya se podía apreciar una inhibición relevante de la respiración con respecto a los adipocitos control, mientras que en el caso de la rotenona, se apreciaba una disminución del consumo de oxígeno más pronunciada a partir de los 10-20 minutos. Al final de la cinética, los adipocitos tratados con metformina y aquellos tratados con rotenona presentaban valores de consumo de oxígeno bastante similares.

Por tanto, de este primer dato pudimos concluir que la metformina entraba en el adipocito rápidamente y disminuía la velocidad de la cadena respiratoria mitocondrial inhibiendo el complejo I. Este efecto era visible a partir de los 20-30 minutos de tratamiento hasta las 2 horas. Hay que resaltar que para el tipo de estudio que queríamos realizar fue importante obtener unas condiciones de inhibición donde la metformina y la rotenona tuviesen un

efecto parecido sobre la respiración mitocondrial. Esto fue crítico para la realización de la segunda parte del ensayo.

A

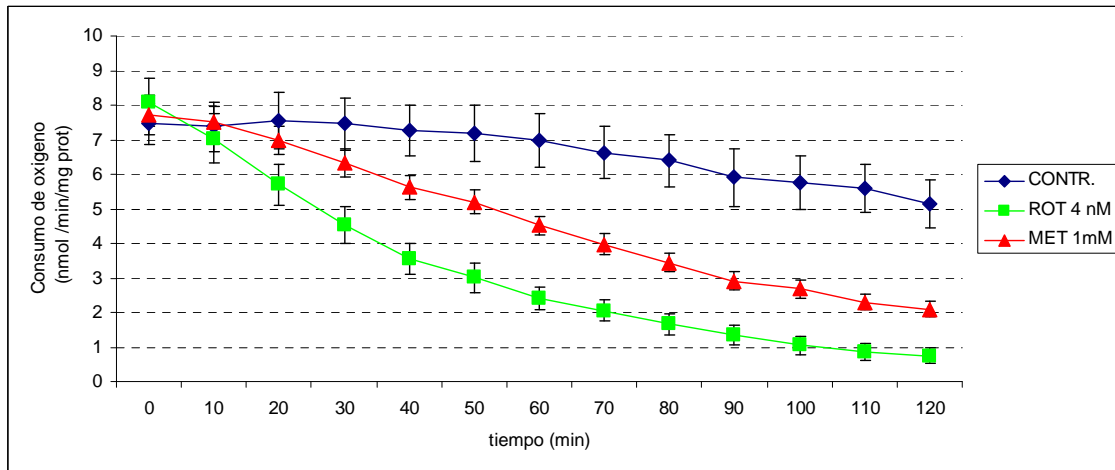


Fig. R21. La metformina inhibe rápidamente la respiración mitocondrial en el adipocito blanco. El día 7 de diferenciación los adipocitos se plaquearon en las placas XF de 24 pocillos y se esperaron 48 horas para garantizar una correcta diferenciación. El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos bajo 3 condiciones distintas: Células sin tratar (CONTR) y células tratadas con 1 mM metformina (MET) y células tratadas con rotenona 4 nM (ROT). Los tiempos de tratamientos fueron 2,6,15,24 y 48 horas. **(A)** El consumo de oxígeno disminuye notablemente en las muestras tratadas con metformina, con respecto a los controles en todos los tiempo de tratamiento. Esta inhibición de la respiración mitocondrial es visible ya a partir de los 20-30 minutos.

5.1.2 Comparación del efecto del FCCP sobre la capacidad máxima respiratoria de la metformina y de la rotenona

Una vez establecido detalladamente la cinética de inhibición de la metformina en el adipocito blanco, el siguiente objetivo fue ahondar más en el conocimiento del efecto de la metformina sobre la respiración en presencia del FCCP.

Para ello, se repitió el ensayo detallado en el anterior apartado (5.1.2), en el cual tras la última lectura de consumo de oxígeno efectuada a los 120 minutos, se hicieron las adiciones de oligomicina, FCCP y rotenona + antimicina A respectivamente. Como se observa en la figura R22, A tras la adición del FCCP, los adipocitos tratados con metformina (azul claro) y los adipocitos control (rojo) mostraban un aumento en el consumo de oxígeno que alcanzaba valores parecidos. Sin embargo, con el FCCP, los adipocitos tratados con rotenona (azul oscuro) no eran capaces de alcanzar estos valores.

En la figura R22, B se muestra un experimento representativo en el cual el día 9 de diferenciación los adipocitos se trataron con metformina 1 mM durante 6 horas o con rotenona 4 nM durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se analizaron sus tasas de consumo

de oxígeno. Se observa que tanto las muestras tratadas con rotenona (verde) como las tratadas con metformina (azul claro) presentan valores de consumo de oxígenos muy similares entre ellos e inferiores a las muestras control. Sin embargo, tras añadir el FCCP, el consumo de oxígeno incrementa sensiblemente en las muestras tratadas con metformina hasta alcanzar valores cercanos a los controles, mientras que la respiración mitocondrial sigue inhibida en las muestras tratadas con rotenona.

Todos estos datos son confirmados por el análisis estadístico que se muestra en las figuras R22, C y D. En la figura C se observa que en presencia de FCCP, la capacidad respiratoria de los adipocitos en presencia de metformina no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles. Sin embargo la tasa de consumo de oxígeno en presencia de rotenona es 4 veces menor que en los controles. En la figura D se muestra la relación entre la capacidad máxima de respiración y la respiración basal. En este caso es mayor en las células tratadas con metformina.

En función de los datos que se acaba de citar, concluimos que la rotenona y la metformina tienen un mecanismo de acción distinto sobre la respiración mitocondrial: la rotenona inhibe de forma permanente el complejo I, así que cuando se estimula la respiración por FCCP el consumo de oxígeno sigue estando limitado con respecto al control. Por otro lado, la metformina disminuye la velocidad de la respiración a través de una inhibición del complejo I, pero a diferencia de la rotenona, su inhibición es reversible y se anula por completo en presencia del FCCP.

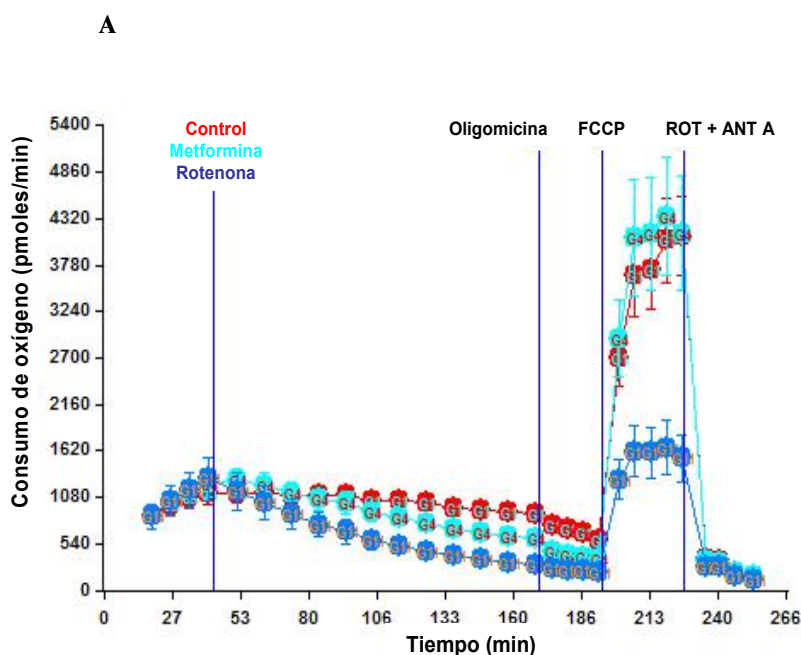


Fig. R22. El FCCP revierte la inhibición de la respiración mitocondrial provocada por metformina en el adipocito blanco. El día 7 de diferenciación los adipocitos se plaquearon en las placas XF de 24 pocillos. (A) El día 9 de diferenciación los adipocitos se trataron in situ bajo 3 condiciones distintas: Células sin tratar (CONTR) y células tratadas con 1 mM metformina (MET) y células tratadas con rotenona 4 nM (ROT). La capacidad máxima de respiración de en presencia de FCCP alcanza valores prácticamente idénticos entre CONTR y MET, mientras que las muestras ROT siguen presentando un menor consumo de oxígeno.

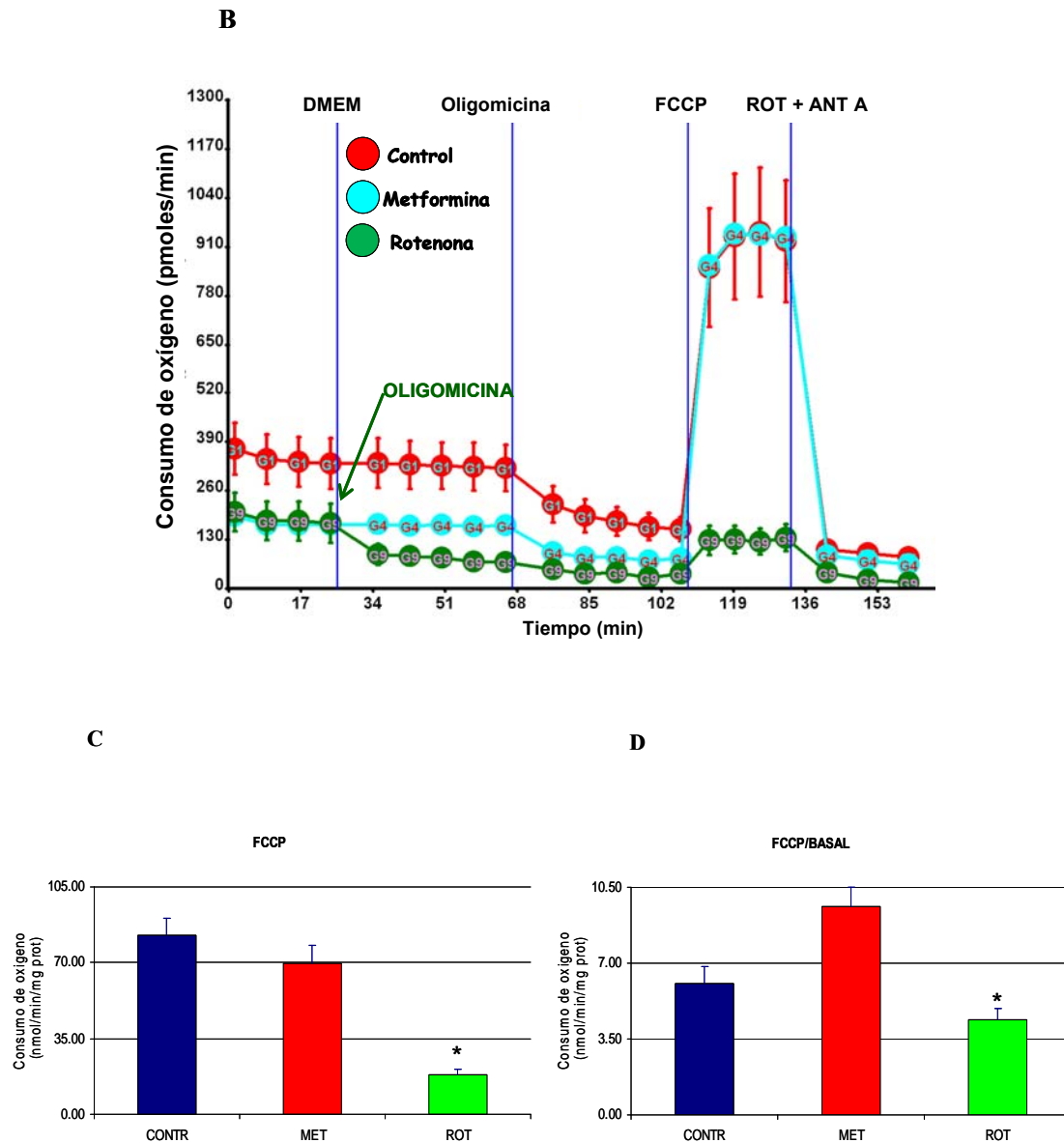


Fig. R22. El FCCP revierte la inhibición de la respiración mitocondrial provocada por metformina en el adipocito blanco. El día 7 de diferenciación los adipocitos se plaquearon en las placas XF de 24 pocillos. **(B)** El día 9 de diferenciación se trataron los adipocitos bajo 3 condiciones distintas: Células sin tratar (**CONTR**) y células tratadas con 1 mM metformina (**MET**) y células tratadas con rotenona 4 nM (**ROT**). **CONTR** y **MET** se trataron durante 6 horas, mientras que **ROT** durante 1 hora. La capacidad máxima de respiración de las células en presencia de FCCP alcanza valores muy parecidos entre **CONTR** y **MET**, mientras que las muestras **ROT** siguen presentando un menor consumo de oxígeno. **(C)** En presencia de FCCP los valores de la tasa respiratoria de **CONTR** y **MET** son similares, mientras que la rotenona presenta una tasa respiratoria 4 veces menor. **(D)** El ratio entre la capacidad máxima de respiración y el consumo de oxígeno basal (FCCP/BASAL) demuestra como los adipocitos tratados con metformina tienen una capacidad respiratoria igual que el control, no obstante su respiración basal se encuentre inhibida. Por el contrario los adipocitos tratados con rotenona evidencian que la velocidad de la respiración sigue inhibida. Las barras de error representan el e.s.m., que se obtuvieron a partir del análisis de al menos 3 experimentos independientes.

DISCUSIÓN

PARTE I

EL PAPEL DE LA UCP2 EN EL ADIPOCITO BLANCO

1.1 INDUCCIÓN DE LA UCP2 POR METFORMINA

A pesar de que la UCP2 se descubrió hace ya 12 años y que hay más de un millar de artículos publicados sobre esta proteína, a día de hoy se desconoce cual es su actividad en la célula. Por su alta similitud en aminoácidos con la UCP1 se asumió que la UCP2 era también una proteína desacoplante y, por tanto, que debería estar implicada en procesos que comportan un gasto energético. Los primeros estudios de actividad de UCP2 en sistemas de expresión heterólogos o en sistemas de reconstitución apuntaban a una actividad desacoplante (Jaburek and Garlid 2003). Sin embargo, hasta ahora no hay datos concluyentes que demuestren esta actividad *in vivo* y a los bajos niveles fisiológicos de expresión de esta proteína. Lo que es curioso es que se ha implicado a la UCP2 con múltiples procesos fisiológicos y patológicos: secreción de insulina, protección frente al estrés oxidativo, metabolismo de la glucosa, cáncer, diabetes, obesidad, enfermedades neurodegenerativas... (ver la parte 3 de la Introducción). Sin embargo, el principal problema en relación a la UCP2 es comprender cual es su función precisa en la fisiología de la célula y cómo esa actividad está regulada para explicar de qué manera esta proteína puede estar implicada en procesos biológicos tan dispares.

Dentro de las diferentes hipótesis planteadas en relación a la función de UCP2, crecientes evidencias apuntan a que la UCP2 tenga un papel protector frente al estrés oxidativo. Este papel fue sugerido inicialmente por el grupo de Casteilla, tras la observación de que la inhibición de la UCP2 por GDP inducía un aumento en el potencial de la membrana mitocondrial interna y en la producción de ROS (Negre-Salvayre, Hirtz et al. 1997). De manera análoga, el primer fenotipo que se describió en los ratones *knockout* para la UCP2, fue que los niveles de ROS en macrófagos eran bastante más elevados que en los ratones *wildtype* después de haberlos sometido a infección por *toxoplasma gondii* (Arsenijevic, Onuma et al. 2000). Diversos estudios realizados posteriormente respaldaron la hipótesis de que la UCP2 esté implicada en la prevención de la producción de ROS. En este sentido se ha descrito que la UCP2 tiene un papel neuroprotector frente al estrés oxidativo tras un proceso de isquemia (Mattiasson, Shamloo et al. 2003). En otros trabajos se ha observado que las células cancerígenas aumentan la expresión de UCP2 como sistema de defensa frente a agentes prooxidantes utilizados en la quimioterapia (Derdak, Mark et al. 2008). Del mismo modo, ciertos desordenes metabólicos que implican la disfunción de la célula β están causados por un elevado nivel de ROS y presentan una mayor expresión de la UCP2

(Krauss, Zhang et al. 2005; Affourtit and Brand 2008). Esto demuestra que el papel de la UCP2 en el estrés oxidativo está bien documentado en distintos tejidos.

En relación con esto, nuestro grupo se interesó por un aspecto muy concreto de la UCP2: su papel en el metabolismo del tejido adiposo blanco. Si antiguamente el TAB era visto como un simple tejido de almacenamiento de energía en forma de triglicéridos, hoy se le considera el mayor órgano endocrino presente en el organismo (ver la parte 4 de la Introducción). Del TAB se secretan numerosas proteínas llamadas adipocinas, las cuales no sólo son claves en la regulación del propio tejido, sino además controlan la actividad de otros como músculo, hígado, páncreas y cerebro (Trayhurn and Wood 2004; Trujillo and Scherer 2006). En los años posteriores al descubrimiento de la UCP2 se demostró que, tras la estimulación del metabolismo lipídico en el adipocito blanco en condiciones de hiperleptinemia, disminuyen los niveles de mRNA de enzimas implicados en la lipogénesis, mientras que aumentaban los niveles de mRNA de enzimas implicados en la lipólisis, y curiosamente también los de UCP2 (Zhou, Shimabukuro et al. 1997; Ceddia, William et al. 2000). Esto podría estar indicando que la UCP2 estaba implicada en la movilización de las reservas de triglicéridos, facilitando la oxidación de las grasas sin que dicha oxidación estuviera acoplada a otros procesos que requieran de esta energía. Por otro lado, hay que tener en cuenta que en estas condiciones los niveles de ácidos grasos libres son elevados y pueden causar un estrés oxidativo importante debido a un aumento de ROS en la célula. En este sentido se ha demostrado que el palmitato, uno de los ácidos grasos más comunes que se encuentran en nuestra dieta, induce “lipoapoptosis” en distintos modelos celulares, incluso células endoteliales (Yamagishi, Okamoto et al. 2002). A pesar de que el mecanismo por el cual el palmitato produce apoptosis no está claro, se ha sugerido que el aumento de ROS sea clave para que se inicie este proceso (Cacicedo, Benjachareowong et al. 2005; Orrenius 2007).

Por tanto, nosotros decidimos que en este contexto fisiológico concreto, donde el metabolismo lipídico está estimulado, sería interesante determinar si el papel principal de la UCP2 en el tejido adiposo blanco es disminuir la eficiencia energética favoreciendo la oxidación de los ácidos grasos y/o proteger frente al estrés oxidativo provocado por un exceso de ácidos grasos libres.

Los cambios metabólicos inducidos por la leptina son mediados por la AMPK, una ruta de señalización que es utilizada también por la metformina. Se trata del fármaco que se utiliza con más frecuencia para ayudar al control de los niveles de glucosa sanguínea en las personas con diabetes tipo 2 (ver el apartado 4.2.1.1 de la Introducción). Los datos presentados en esta memoria han demostrado por primera vez que la metformina consigue inducir la expresión de UCP2 en el adipocito blanco. Esto se pudo comprobar tanto *in vivo*

(Fig. R5 de los Resultados), utilizando como modelo animal ratones C57/BL6, como *in vitro* (Fig. R4 y R9 de los Resultados), utilizando como modelo celular la línea adipocitaria 3T3-L1. Según los resultados de la figura R4, el nivel de expresión de la UCP2 durante la diferenciación aumentaba en presencia de metformina, obteniéndose el máximo de expresión el día 9, donde se alcanzaba un incremento significativo de 2,5 veces en las muestras tratadas con metformina y de 3 veces en las muestras tratadas con metformina + insulina con respecto al control y a las muestras tratadas con insulina. De forma análoga, en la figura R9 hemos valorado el efecto de la metformina sobre la inducción de la UCP2 en un tiempo comprendido entre 2 horas y 48 horas en el adipocito maduro. Se determinó que los niveles de UCP2 son superiores con respecto al control, obteniéndose una inducción máxima a las 24 horas de tratamiento (casi 2 veces superior al detectado en el control). Cabe resaltar que, a pesar de que en el adipocito en fase de diferenciación se activa un amplio número de genes, proteínas y factores de transcripción que favorecen la adipogénesis y su transformación morfológicas (Ntambi and Young-Cheul 2000), mientras que en el adipocito maduro la expresión de estos genes disminuye, observamos siempre una inducción clara de UCP2 en presencia de metformina.

Sin embargo, existen trabajos previos que discrepan con nuestros resultados. Savontaus y colaboradores realizaron un estudio en un modelo de ratas obesas (*Zucker fa/fa*), a las que se les administró una dosis diaria de metformina durante 19 días (Savontaus, Rouru et al. 1998). Del análisis de los niveles de mRNA de UCP2 en el tejido blanco de estas ratas, se comprobó que la UCP2 no variaba su expresión en presencia de metformina. No obstante exista una similitud en la dosis de metformina administrada diariamente entre este trabajo y el nuestro, opinamos que el motivo de esta discrepancia radica probablemente en que en nuestros trabajos se analizaron los niveles de expresión de la proteína UCP2 y no los cambios en el mRNA como en el trabajo de Savontaus y su grupo. Como se comentó, la UCP2 presenta una regulación a nivel traduccional, por tanto variaciones en el mensajero no necesariamente son acompañadas por cambios en la proteína y viceversa (Hurtaud, Gelly et al. 2006). Así es probable que este sea el motivo de la discrepancia entre los datos de los dos trabajos.

1.2 INDUCCIÓN DE LA UCP2 EN EL ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo está causado por un desequilibrio entre la producción de ROS y la capacidad de la célula de detoxificar rápidamente los intermediarios reactivos o reparar el daño resultante. Una menor eficiencia del sistema antioxidante genera un exceso de ROS, que puede causar importantes daños oxidativos a las distintas biomoléculas de la célula, incluyendo las proteínas, los lípidos y el ADN (Ott, Gogvadze et al. 2007). En la célula, cualquier proteína o sistema enzimático capaz de transferir electrones puede generar ROS.

Es el caso del citocromo p450 (en el retículo endoplasmático), la xantina oxidasa o NADPH oxidasa. No obstante, es la mitocondria la principal fuente de ROS en la célula. Como se ha descrito en el apartado 1.2.1 de la Introducción, el complejo I y el complejo III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial son el lugar donde se produce mayoritariamente el anión superóxido. La formación del O_2^- depende del estado de los centros redox de los dos complejos, que a su vez depende del $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. En condiciones de un elevado gradiente de potencial electroquímico de protones, la respiración mitocondrial es lenta y se favorece la reducción monovalente del oxígeno, con consiguiente formación de superóxido. Así que aquellos factores que consiguen disminuir el $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ se pueden considerar potenciales protectores frente al estrés oxidativo (Brookes 2005). Ciertos agentes citotóxicos como la rotenona (inhibidor clásico del complejo I) son capaces de aumentar la formación del superóxido, puesto que su acción genera un elevado $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$. Se ha descrito que también la metformina es un inhibidor del complejo I (Owen, Doran et al. 2000), aunque estudios bioenergéticos han demostrado que dicha inhibición es bastante más leve que en el caso de la rotenona (Batandier, Guigas et al. 2006). Estos datos sugieren que este fármaco podría estar causando un aumento de los niveles de ROS a través de la inhibición del complejo I.

Los datos presentados en esta memoria demuestran que la metformina induce estrés oxidativo en el adipocito blanco. Según la figura R6 de los Resultados, los niveles de ROS durante la diferenciación aumentaban en presencia de metformina, obteniéndose el máximo de expresión el día 9, donde se alcanzaba un incremento significativo de 1,7 veces en las muestras tratadas con metformina y de 1,5 veces en las muestras tratadas con metformina + insulina con respecto al control y a las muestras tratadas con insulina. Este dato fue respaldado por los resultados que se muestran en la figura R7, donde se determinó que la actividad enzimática de la aconitasa disminuye en presencia de metformina, obteniéndose el máximo de inhibición el día 9, estimado en 2 veces en las muestras tratadas con metformina y en 2,2 veces en las muestras tratadas con metformina + insulina con respecto al control y a las muestras tratadas con insulina. De forma análoga, en la figura R10 de los Resultados comprobamos el efecto de la metformina sobre la formación de ROS en un tiempo comprendido entre 2 horas y 48 horas en el adipocito maduro. También en este caso se observó un aumento de ROS en presencia de metformina, obteniéndose una inducción máxima a las 24 horas de tratamiento de casi 2 veces con respecto al control. Estos datos demuestran claramente que la metformina induce estrés oxidativo en el adipocito blanco, probablemente a través de la inhibición del complejo I. Comparando los datos sobre el estrés oxidativo y los niveles de expresión de UCP2 cabe destacar que el incremento máximo de los niveles de ROS coincide con la inducción máxima de expresión de la UCP2. Por tanto, se puede afirmar que el aumento de ROS y la inducción de UCP2 presentan una estrecha correlación.

Está descrito que las ROS son una señal clave para que se induzca la apoptosis (Orrenius 2007). En este sentido Singh y colaboradores han mostrado que el arsénico es capaz de inducir la apoptosis a través del aumento de ROS y activación de las caspasas. Con un agente antioxidante como el N-acetilcisteína conseguían eliminar el exceso de ROS y a la vez bloquear la apoptosis celular (Singh, Greene et al. 2009). Se ha demostrado también que la metformina es capaz de inducir apoptosis (Wang, Li et al. 2008), presumiblemente a través de la generación de ROS. De acuerdo con estos estudios, tal y como se muestra en la figura R11 de los Resultados, los adipocitos tratados con metformina reducen el número de células vivas de un 20-35% a partir de la 15 horas de tratamiento hasta las 48 horas, que corresponde exactamente al incremento de la tasa de apoptosis (20-35%) detectada en el mismo rango de tiempo en los adipocitos tratados con metformina, con respecto a los adipocitos control.

Puesto que el estrés oxidativo y la apoptosis conllevan una alteración de la homeostasis oxido-reducción en la célula (Trachootham, Lu et al. 2008), comprobamos si en presencia de metformina el sistema antioxidante se encontraba activado. En esta memoria (Fig. R12 de los resultados) se ha reflejado que la actividad enzimática de la SOD se encuentra incrementada en presencia de metformina, obteniéndose una inducción máxima a las 24-48 horas de tratamiento de 2,5 veces con respecto al control. De forma análoga, se observó que los niveles de glutatión oxidado aumentaban en presencia de metformina, alcanzando un máximo a las 24-48 horas de tratamiento de 2 veces con respecto al control (Fig. R13 de los Resultados). Por tanto, se puede afirmar que el sistema antioxidante estaba activado durante los tratamientos con metformina. Estos resultados están respaldados por trabajos previos de otros autores que, como se ha comentado en el apartado 4.1.2.1 de la Introducción, describieron que este medicamento es capaz de generar ROS y apoptosis en distintos sistemas celulares (Pavlovic, Kocic et al. 2000; Skrha, Prazny et al. 2007; Wang, Li et al. 2008).

1.3 CORRELACIÓN ENTRE LA UCP2 Y LA AMPK

Está ampliamente descrito que la metformina ejerce sus efectos metabólicos, por lo menos en parte, a través de la activación de la AMPK (Santomauro Junior, Ugolini et al. 2008). Como ejemplo se puede citar un reciente estudio realizado con ratones deficientes del gen LKB1 (proteína responsable de la fosforilación de la AMPK), que ha puesto de manifiesto que la metformina no es capaz de disminuir los niveles de glucosa en la sangre en estos ratones, demostrando como la activación de la AMPK es esencial para los efectos metabólicos de la metformina (Shaw, Lamia et al. 2005).

Esta proteína es el principal regulador celular del estado energético de la célula (ver el apartado 4.1.2 de la Introducción). Es activada por un aumento en el ratio AMP:ATP causado o por un alteración en la producción de ATP (falta de glucosa, hipoxia...) o por un aumento en el consumo de ATP (contracción muscular, ejercicio...) (Hardie, Hawley et al. 2006). Una vez activada la AMPK estimula las vías catabólicas que generan ATP como la β oxidación y la glicólisis, mientras que inhibe aquellas que consumen ATP como los procesos de biosíntesis, proliferación y crecimiento celular. Algunos autores han demostrado que la activación de la AMPK no sólo se debe al aumento del AMP celular. En este sentido el grupo de Hardie probó que la metformina activaba la AMPK sin detectar cambios en el ratio ATP:AMP (Hawley, Gadalla et al. 2002). En presencia de oligomicina y metformina vieron que la oligomicina activaba la AMPK a la vez que detectaban mínimos cambios en los niveles de ATP, confirmando la enorme sensibilidad de la AMPK a pequeños cambios en la homeostasis energética. Por otro lado, la metformina era capaz de activar la AMPK sin que causara importantes cambios en el ratio ATP:AMP.

En los experimentos descritos en esta memoria se aprecia como la metformina activa la AMPK en el adipocito blanco. Como se muestra en la figura R17 de los Resultados los niveles de AMPK fosforilado se encuentran incrementados en presencia de metformina, obteniéndose un valor máximo a las 24-48 horas de tratamiento de casi 2 veces con respecto al control. Además, cabe destacar que dicha activación coincide con la inducción de la UCP2 por el mismo fármaco (Fig. R9 de los Resultados). Es decir, tiene lugar a partir de las 2 horas de tratamiento y alcanza un máximo alrededor de las 24 horas.

Recientemente la AMPK ha recibido mucha atención por sus propiedades antiapoptóticas. En este sentido se ha demostrado que el 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranoside (AICAR), un activador de la AMPK, bloquea la apoptosis inducida por el palmitato en varios modelos celulares, aunque el mecanismo no está del todo claro (Hickson-Bick, Buja et al. 2000; Blazquez, Geelen et al. 2001). Kukidome y colaboradores vieron que el AICAR reduce la formación de ROS inducida por un estado de hiperglicemia en células endoteliales, evitando la apoptosis de esta células (Kukidome, Nishikawa et al. 2006). De manera análoga se comprobó que la activación de la AMPK inhibe la apoptosis inducida por el metilglioxal, disminuyendo la formación de ROS en células de Schwann de ratón (Ota, Nakamura et al. 2007). Por tanto, puesto que la máxima activación de la AMPK, que se detecta a las 24-48 horas de tratamiento, coincide con un aumento de la apoptosis en los adipocitos tratados con metformina, no se puede descartar que tanto la UCP2 como la AMPK estén implicadas en prevenir el aumento de ROS y, por tanto, la apoptosis en el adipocito blanco. En este sentido, algunos experimentos preliminares que se están realizando actualmente en nuestro laboratorio han mostrado que

la inhibición de la AMPK a través de un inhibidor comercial (compuesto C), disminuye no sólo los niveles de AMPK fosforilado en el adipocito, sino que también se aprecia una fuerte bajada de los niveles proteicos de UCP2 que coincide con una apoptosis celular de más de un 75% después de 24 horas de tratamiento.

En la presenta memoria fue investigada la posibilidad que la AMPK se activara por un cambio en los niveles de ATP. La evidencia que tuvimos fue que en presencia de metformina el ATP celular disminuye a partir de las 15 horas de tratamiento, mientras que entre las 2 y 6 horas de tratamiento no se señala ninguna variación de este nucleótido (Fig. R17, C de los Resultados). En este sentido existe una aparente discrepancia, puesto que en las primeras 6 horas de tratamiento no detectamos cambios significativos en el ATP, a pesar de que la AMPK ya estaba activada. En concordancia con nuestros datos, Hawley y colaboradores mostraron que la AMPK se puede activar independientemente del cambio en los niveles de ATP celular, aunque no hayan podido explicar el mecanismo por el cual la metformina activa esta quinasa (Hawley, Gadalla et al. 2002). En nuestra opinión, una posibilidad podría responder a esta cuestión:

Las principales fuentes generadoras de ATP en la célula son la fosforilación oxidativa y la glicolisis. Puesto que la metformina inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial es probable que disminuya la eficiencia energética. Este déficit de ATP puede ser compensado por un aumento en la actividad glicolítica. En este sentido, como ya se comentó en el apartado 4.3 de la Introducción, los tratamientos con metformina aumentan la producción de lactato en la célula, lo que indica que hay un aumento de la tasa glicolítica anaerobia (Bailey, Wilcock et al. 2008). Además este efecto depende de la activación de la AMPK, puesto que mejora la sensibilidad a la insulina, aumentando la captación de la glucosa por las células, estimulando así la glicolisis. De acuerdo con esta hipótesis, se ha descrito que la AMPK favorece la translocación del receptor GLUT4 en la membrana plasmática y, por lo tanto, aumenta el transporte de la glucosa hacia el interior de la célula (Yamaguchi, Katahira et al. 2005). Por lo tanto, es nuestra opinión que el aumento de la actividad glicolítica podría ser responsable de mantener los niveles de ATP celular, por lo menos durante las primeras 6 horas de tratamiento.

1.4 PAPEL DE LAS ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN EL EFECTO DE LA METFORMINA

En un trabajo publicado a principio del 2008, se propuso que los efectos de la AMPK podrían ser mediados, en parte, por la activación de la UCP2 (Kim, Kim et al. 2008). Estos autores observaron que la activación de la AMPK por el AICAR conseguía prevenir la formación de ROS causada por altas concentraciones de palmitato, lo que provocaba a su vez una inhibición de la apoptosis. En este contexto se detectó que los niveles de

expresión de la UCP2 aumentaban al mismo tiempo que los niveles de AMPK fosforilado. De estos datos asumieron que posiblemente la activación de la AMPK estaría previniendo la formación de ROS a través de la inducción de UCP2. Aunque el mecanismo por el cual la AMPK induce la UCP2 no es conocido, ellos proponen que, debido a que la expresión del gen de UCP2 es regulado por el coactivador-1 de los receptores PPAR- γ (PGC-1) y que la expresión de PGC-1 es inducida por AMPK, la PGC-1 podría ser un regulador de la inducción de UCP2 mediada por la AMPK. En nuestro trabajo se ha intentado esclarecer la posible correlación entre la UCP2 y la AMPK y el posible papel de ambas proteínas en el estrés oxidativo provocado por metformina en el adipocito blanco. Nuestros resultados habían revelado que en condiciones de estrés oxidativo provocado por la metformina, la AMPK y la UCP2 aumentaban sus niveles celulares. Sin embargo, estos datos no aclaraban el papel de las dos proteínas en este contexto.

En la parte 4 de los Resultados de esta memoria se refleja que, gracias al uso del tiron, compuesto antioxidante análogo de la enzima SOD, se redujo el aumento de superóxido provocado por la metformina. Como se observa en la figura R18 de los Resultados, los niveles de ROS no alcanzan los valores detectados en presencia de metformina, cuando se tratan las muestras con metformina + tiron, obteniéndose valores estadísticamente significativos entre 6 y 24 horas. Tras comprobar en nuestro modelo que el tiron reducía los niveles de superóxido, estudiamos el grado de expresión de la UCP2 y de fosforilación de la AMPK. En el caso de la UCP2 vimos que en presencia de este agente antioxidante desaparecía la inducción de su expresión y sus niveles eran similares a los niveles basales detectados en ausencia de metformina (Fig. R19, D de los Resultados). Sin embargo, en el caso de la AMPK, vimos que en presencia de este agente antioxidante no se apreciaban cambios significativos entre los niveles detectados en las muestras metformina + tiron, con respecto a las muestras tratadas con metformina (Fig. R19, C de los Resultados). Así, se dedujo que la inducción de la UCP2 depende exclusivamente del aumento de superóxido mediado por metformina, mientras que la activación de la AMPK depende de otra señal mediada por metformina, independiente de los niveles de superóxido. An y colaboradores, han propuesto recientemente que el peroxinitrito es capaz de activar la AMPK sin que el ratio ATP:AMP se encuentre modificado (An, Wang et al. 2007). De manera análoga, otros autores observaron que la formación del ONOO⁻ en presencia de metformina es clave para la activación de la AMPK (Zou, Kirkpatrick et al. 2004). Así, en nuestro caso, es posible que la activación de la AMPK se deba a otras ROS como el peroxinitrito o se deba al aumento de AMP celular y que la glicolisis compense la menor producción de ATP por lo menos las primeras 6 horas de tratamientos.

Por tanto, nuestra interpretación de los datos presentes en esta memoria señala que la UCP2 estaría implicada en limitar la formación de O₂⁻, mientras que la AMPK ejercería

sus efectos metabólicos independientemente de la producción de este radical. Es evidente que se requieren estudios más detallados y específicos para poder caracterizar de manera clara los efectos de la metformina en el adipocito, pero en función de los datos presentados en esta memoria, podemos proponer un modelo que hemos esquematizado en la figura D1.

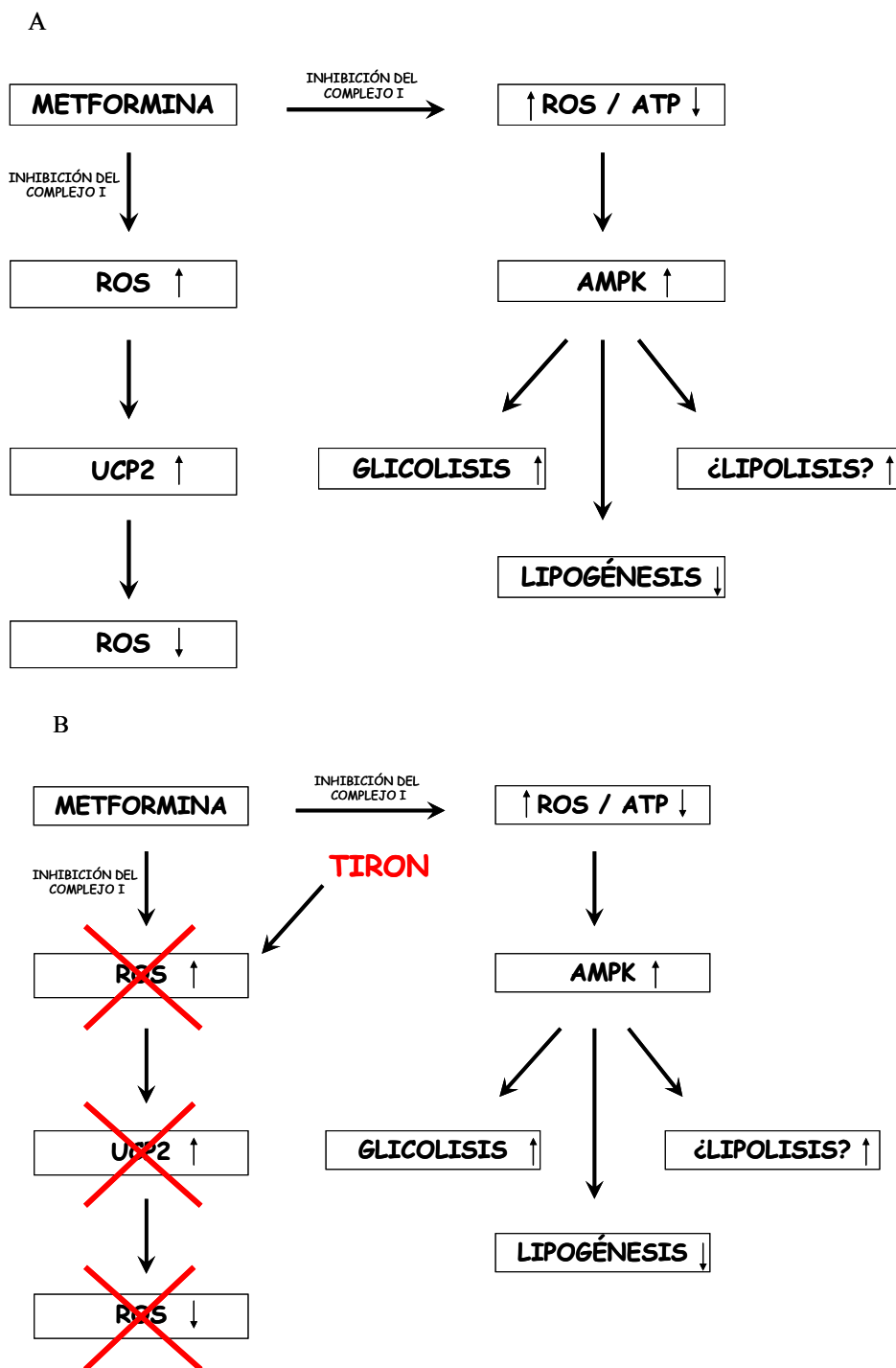


Fig. D1. Modelo de la acción de la metformina en el adipocito blanco. (A) La metformina, mediante la inhibición del complejo I, causa un aumento de la formación de ROS. Este aumento induce la expresión de UCP2, cuya función consiste en limitar la producción de las ROS y así proteger frente al estrés oxidativo inducido por metformina. Al mismo tiempo, la metformina causa una disminución del ATP celular probablemente a través de la inhibición de la respiración mitocondrial. Esta es la señal para que la AMPK se active y determine una inhibición de la lipogénesis. Posiblemente las primeras 6 horas de tratamiento, se asiste a un aumento de la actividad glicolítica para compensar la disminución de los niveles de ATP celular. Por otra parte, es posible que se induzca también la lipólisis, aunque es un efecto que se detecta solamente en el adipocito en fase de diferenciación. **(B)** Se demuestra como las ROS son la señal para que la UCP2 se induzca. Por el contrario, la AMPK no es activada por las ROS.

1.5 EFECTO DE LA AMPK EN EL METABOLISMO LIPÍDICO DEL ADIPOCITO BLANCO

Como se comentó en el apartado 4.3 de la Introducción, en el organismo la metformina parece actuar de forma diferente según el tejido analizado: reduce la absorción de los carbohidratos de la dieta diaria a través del intestino; reduce la producción de glucosa por el hígado; incrementa la sensibilidad a la insulina en el tejido muscular y aumenta la entrada de la glucosa al tejido adiposo blanco. A nivel celular, **en el hígado** consigue inhibir la actividad de las enzimas fosfoenolpiruvato carboxiquinasa (PEPCK) y glucosa-6-fosfatasa, causando una disminución de la gluconeogénesis (Lochhead, Salt et al. 2000; Koo, Flechner et al. 2005). Más recientemente se ha demostrado que la metformina causa una reducción de la expresión génica de los enzimas responsables de la síntesis de la glucosa, actuando sobre el complejo factor de transcripción CREB-CBP-TORC2 provocándose la disociación y por tanto la inactivación (He, Sabet et al. 2009). **En el músculo** promueve la expresión y translocación en la membrana plasmática del receptor de glucosa GLUT4. Además estimula la glicólisis y la oxidación de los ácidos grasos aumentando la actividad de la 6-fosfato-2-quinasa y de la CPT-1 respectivamente (Winder, Wilson et al. 1997; Marsin, Bouzin et al. 2002). **En el adipocito blanco** existen datos concordantes sobre sus efectos inhibidores de la lipogénesis, disminuyendo la actividad de las enzimas ACC y FAS (Rossmeisl, Flachs et al. 2004). Sin embargo, sus efectos han sido investigados menos que en músculo e hígado, por tanto los datos a disposición no aclaran ciertos aspectos. En primer lugar, como se ha mencionado anteriormente, se ha descrito que el receptor GLUT4 es translocado en la membrana plasmática en presencia de metformina (Yamaguchi, Katahira et al. 2005). Esto puede aumentar la tasa glicolítica, aunque son necesarios más estudios que corroboren este dato. En segundo lugar se ha observado que la metformina es capaz de inhibir la lipólisis actuando sobre la lipasa sensible a hormonas (Daval, Diot-Dupuy et al. 2005), a pesar de que estudios previos han mostrado que la activación de la AMPK promueve la hidrólisis de los triglicéridos en el adipocito (Yin, Mu et al. 2003).

A raíz de estos datos, los resultados que se exponen en esta memoria sobre el estado metabólico del adipocito requieren un análisis detallado. Tal y como se muestra en la figura R14, B de los Resultados, se estudiaron los niveles de ACC fosforilado en presencia de metformina en un tiempo comprendido entre 2 horas y 48 horas en el adipocito maduro. En este caso se observó un aumento de dichos niveles a lo largo del tiempo en presencia de metformina, obteniéndose un valor máximo a las 24 horas de tratamiento de más de 2 veces con respecto al control. En la figura R14, C se reflejan los datos sobre la actividad de la FAS. En este caso, se detectó una disminución de su actividad, obteniéndose un valor de inhibición estadísticamente significativo entre 15 y 48 horas, estimado en 1,8 veces.

Estos datos señalan que la metformina disminuye la actividad enzimática de la ACC y de la FAS, demostrando así que la lipogénesis se encuentra inhibida.

Sin embargo, los datos sobre el catabolismo lipídico no concuerdan con el aumento de la actividad de la AMPK. Tal y como se muestra en la figura R16 de los Resultados, la actividad lipolítica es muy parecida entre las muestras tratadas con metformina y las muestras control en un tiempo comprendido entre 2 horas y 48 horas. Por tanto, este resultado apuntaría, *a priori*, que la inducción de la AMPK por metformina no va acompañada de una inducción de la lipólisis en el adipocito. De acuerdo con nuestros datos, algunos trabajos anteriores evidenciaron como una activación de la AMPK en adipocitos blancos coincide con una disminución de los niveles de mRNA de los enzimas lipogénicos (Kirchgessner, Uysal et al. 1997) y activando la AMPK con el AICAR, se inhibe la lipólisis inducida por la vía β -adrenérgica (Daval, Diot-Dupuy et al. 2005). Otros estudios han demostrado que no solo AICAR, sino que también biguanidas como la metformina y la fenformina disminuyen la lipólisis y esto se explica por la activación de la AMPK (Huypens, Quartier et al. 2005).

Sin embargo, queremos resaltar que los datos de la figura R8 de los resultados muestran que el día 12 de diferenciación se detectan un incremento de la lipólisis de más de 2 veces en las muestras tratadas con metformina y en 1,4 veces en las muestras tratadas con metformina + insulina con respecto al control y a las muestras tratadas con insulina. Por tanto, no se puede descartar que, aunque no se haya detectado un aumento de la tasa lipolítica entre las 2 y 48 horas (el rango de tiempo en el cual se ha determinado la activación de la AMPK por metformina), este proceso puede ser estimulado después de las 48 horas de tratamiento.

Tras comprobar el estado lipolítico del adipocito blanco durante los tratamientos con metformina, se analizó si el proceso de β oxidación se encontraba estimulado. En la figura R15 puede observarse que no se aprecia un aumento de la oxidación de los ácidos grasos en presencia de metformina con respecto al control. Como ya se comentó en el apartado 4.1.1 de la Introducción, los ácidos grasos normalmente no son oxidados en el mismo tejido debido a la baja actividad de la enzima carnitinpalmityl transferasa-1 (CPT-1) (Martin and Denton 1970). Por tanto, en nuestras condiciones, los ácidos grasos son exportados al exterior de la célula.

1.6 PAPEL DE LA UCP2 EN EL METABOLISMO LIPÍDICO

Como se explicó en los Objetivos, una de las finalidades de esta tesis ha sido dilucidar el papel de la UCP2 en la regulación del metabolismo lipídico en el adipocito blanco tratado

con metformina. Tras un estudio detallado se constató que (como se ha comentado en el apartado anterior) los adipocitos tratados con metformina durante la diferenciación presentan un incremento de la lipólisis en el día 12 de diferenciación (Fig. R8), mientras que los adipocitos maduros tratados entre las 2 y 48 horas no revelaron un aumento de la lipólisis (Fig. R16). Comparando estos dos resultados no se descarta que en los adipocitos maduros se pueda verificar un incremento de la tasa lipolítica posterior a las 48 horas de tratamiento con metformina. De ser este el caso, nuestra conclusión es que se requieren más de 48 horas para que la metformina (a través de la AMPK) ejerza un efecto lipolítico sobre el metabolismo basal del adipocito blanco. En cualquier caso, para que se pueda relacionar la inducción de la expresión de UCP2 con la lipólisis sería necesario que el incremento de la proteína se acompañe con niveles más altos de glicerol libre en el medio de cultivo de los adipocitos. En la figura R4, D puede observarse que aumentan los niveles de UCP2 durante la diferenciación (desde el día 8 hasta el día 12), donde se detecta su máximo de expresión el día 9 (entre 2,5 y 3 veces con respecto al control). Sin embargo el día 12 los niveles de UCP2 han reducido notablemente, debido a que se detecta un incremento de tan sólo 1,2 veces en las muestras tratadas con metformina + insulina y ningunas diferencias significativas en las muestras tratadas con metformina con respecto al control y a las muestras tratadas con insulina. Estos resultados demuestran que la actividad lipolítica se registra en un tiempo distinto de los niveles de expresión de UCP, por lo que estos datos descartarían una implicación de la UCP2 en el catabolismo lipídico.

En el apartado 2.4.2 de la Introducción se explicó que los ácidos grasos son reguladores fisiológicos de la actividad de la UCP1. Sin embargo, a pesar de la alta homología que existe entre UCP1 y UCP2, no se hallan datos concluyentes que demuestren que los ácidos grasos consigan aumentar la conductancia a protones a través de la UCP2 en condiciones fisiológicas. Recientemente se ha comparado la actividad desacoplante de ambas proteínas en la célula β (Galetti, Sarre et al. 2009). En este estudio observaron que cuando se conseguía expresar niveles parecidos de las dos proteínas, ambas no incidían sobre el metabolismo basal de la mitocondria. Sin embargo, cuando se adicionaban ácidos grasos en la célula, solamente las que expresaban UCP1 aumentaban el consumo de oxígeno a la vez que bajaba el potencial electroquímico de protones. Estos datos concuerdan con los nuestros y descartan que el aumento de ácidos grasos en los adipocitos blancos consiga activar la UCP2 y favorecer una oxidación más rápida de los mismos, a la par de UCP1.

Cabe matizar también que nuestros datos discrepan con el grupo de Unger, que, como ya se comentó en el apartado 4.2 de la Introducción, evidenció como en el tejido adiposo blanco, el aumento de los niveles de los enzimas lipolíticos y los que favorecen la β -oxidación coincidía curiosamente con el aumento de la expresión de la UCP2 (Ceddia, William et al. 2000). Además, demostraron que los ácidos grasos eran oxidados en el

interior del adipocito blanco, postulando que la UCP2 aumentaba la velocidad de oxidación de los ácidos grasos.

1.7 HACIA LA COMPRENSIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN DE LA METFORMINA

La metformina es un derivado de la guanidina, el compuesto activo de la *Galega officinalis* (Bailey and Day 1989). Esta hierba fue utilizada durante siglos en Europa como tratamiento de la diabetes desde la época medioeval. El uso de guanidinas y sus derivados (fenformina, metformina y buformina) como agentes terapéuticos para la diabetes *mellitus* data del siglo pasado. A pesar de la larga historia de cinco décadas de uso clínico exitoso de metformina como tratamiento para la diabetes tipo II, su mecanismo de acción sigue siendo un enigma.

Actualmente se acepta la idea de que sus principales dianas son la AMPK y el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial. Ya hace 40 años, en algunos trabajos pioneros de bioenergética, se había observado que las alquilguanidinas eran capaces de inhibir la respiración de mitocondrias de hígado en presencia de glutamato/malato como sustrato (sustrato del complejo I), pero no en presencia de succinato (sustrato del complejo II) (Chappell 1963; Davidoff 1971). En este mismo sentido otros autores demostraron que mitocondrias de hígado de conejillos de india previamente tratados con fenformina mostraban una menor tasa oxidativa del 2-oxoglutarato, pero no de la oxidación del succinato (Gettings, Reeve et al. 1988). Estos datos sugirieron entonces que las guanidas y sus derivados eran capaces de inhibir la gluconeogénesis en el hígado a través de la inhibición de la respiración mitocondrial y síntesis de ATP. Más recientemente se ha propuesto que la inhibición de la gluconeogénesis mediada por metformina promueve la utilización de la glucosa en los tejidos periféricos, mejorando así el estado hiperglicémico de los pacientes diabéticos (Owen, Doran et al. 2000). Más detalladamente estos autores definieron la relación entre inhibición de la gluconeogénesis y la inhibición del complejo I. Observaron que la inhibición del 50% y 80% de la respiración correspondía con una inhibición de la gluconeogénesis del 25 y 60%. De manera análoga El-Mir y colaboradores probaron que, en presencia de metformina a concentraciones que oscilan entre 1-5 mM, el complejo I presenta una inhibición del 25-60% después de treinta minutos, prediciendo una inhibición de la gluconeogénesis del 10-40% (El-Mir, Nogueira et al. 2000). No sólo los medicamentos derivados de la guanidina tienen efectos beneficiosos sobre el metabolismo de la glucosa. Se ha demostrado que la berberina, compuesto utilizado sobretudo en China para curar infecciones intestinales, presenta efectos terapéuticos para el tratamiento de la diabetes (Lee, Kim et al. 2006). Esta droga parece actuar de manera análoga a las biguanidas, inhibiendo el complejo I y activando la AMPK (Turner, Li et al. 2008). Este aspecto matiza la importancia de esta quinasa en los

efectos terapéuticos de los medicamentos antidiabéticos y sugiere que cambios en la homeostasis energética celular son un evento clave en la eficacia de estas drogas al tratamiento de la diabetes tipo II (Brunmair, Staniek et al. 2004).

Los resultados que se exponen en esta memoria sobre el comportamiento bioenergético de los adipocitos blancos en presencia de metformina, concuerdan con los datos que acabamos de citar. Tal y como se refleja en la figura R20, C de los Resultados, nosotros observamos que la metformina inhibe la respiración mitocondrial limitando la actividad del complejo I. Es importante resaltar que el efecto de la metformina se mantiene a lo largo del tiempo con valores de inhibición que oscilan entre 60-70% (Fig. R20, D). Tras constatar que la metformina inhibía la respiración mitocondrial, se hizo un seguimiento en función del tiempo del consumo de oxígeno en presencia de metformina con respecto al control. Como se aprecia en la figura R21 de los Resultados, dicha inhibición era estadísticamente significativa a partir de los treinta minutos y se aproximaba a un 60% al final del ensayo (2 horas).

Si el efecto de la metformina sobre el complejo I esta bien documentado, no existe acuerdo sobre la base molecular de este efecto. Owen y colaboradores proponen que la metformina se acumula en la mitocondria lentamente e interacciona directamente con el complejo I (Owen, Doran et al. 2000). Se propone que su carga positiva le permita entrar en la matriz y actuar desde la cara matricial. Existen datos que apoyan esta teoría: comparando la metformina con otros inhibidores del complejo I de carácter hidrofóbico como los análogos de la fenilpiridina (cargados positivamente), se ha podido observar que estos tienen la tendencia de acumularse en la matriz (Gluck, Youngster et al. 1994). Además, adicionando compuestos de carga negativa se consigue revertir la inhibición de la respiración, lo que resalta la importancia del componente catiónico de la molecula en la interacción de la misma con el complejo I.

Una cuestión debatida actualmente es si la metformina actúa directamente sobre el complejo I o si lo hace de manera indirecta a través de intermediarios moleculares. Algunos autores estudiaron el efecto de la metformina en subpartículas de mitocondrias preparadas a partir de la homogeneización del tejido hepático y muscular de rata. En este caso vieron que en presencia de metformina a concentraciones superiores a 3 mM, se asistía a una caída del control respiratorio (estado 3/estado 4) utilizando glutamato/malato como sustrato. Sin embargo, cuando se utilizaba el succinato como sustrato no se señalaban cambios en la respiración mitocondrial (Brunmair, Staniek et al. 2004). De manera análoga otros autores demostraron que la metformina conseguía disminuir el consumo de oxígeno utilizando glutamato/malato como sustrato, pero no se observaba ningún efecto utilizando succinato como sustrato (Owen, Doran et al. 2000). Lo más

importante es que consiguieron reproducir este efecto en células hepática permeabilizadas, en mitocondrias enteras de hígado y músculo y, finalmente, en subpartículas mitocondriales de los mismos tejidos. Según sus deducciones, esto probaba de forma clara que la metformina tiene un efecto directo sobre el complejo I. Por otro lado, otros autores defienden la idea de que la metformina ejerce una acción indirecta sobre la respiración mitocondrial. En este sentido se verificó que la inhibición de la respiración causada por la metformina era posible solamente cuando las células estaban intactas, sugiriendo que las señales extramitocondriales son críticas para dicho efecto (El-Mir, Nogueira et al. 2000). En concordancia con este dato, el grupo de Leverve observó el efecto inhibitorio que ejerce la metformina sobre la respiración mitocondrial de oocitos de *Xenopus Laevi*. Este estudio revela que el principal sitio de acción de la metformina es la membrana plasmática. Esta interacción es crucial para que la metformina promueva señales intracelulares que causarán la inhibición de la respiración (Detaillé, Guigas et al. 2002).

Cabe resaltar que, gracias al avance tecnológico que supone el uso del analizador “Seahorse” (ver apartado 2.5 de los Materiales y Métodos) como herramienta de trabajo, se pudo investigar el efecto de la metformina sobre la respiración mitocondrial en un contexto más fisiológico que los electrodos convencionales. Así se confirmó que en adipocitos blancos en cultivo la metformina disminuye el consumo de oxígeno en presencia de sustrato del complejo I (Fig R20, A de los Resultados). A pesar de que estos ensayos no aclaran si la metformina tenga una acción directa o indirecta, es importante decir que actualmente se han realizado en nuestros laboratorios ensayos con mitocondrias aisladas de hígado de ratón. Aunque son estudios todavía preliminares, se aprecia que la metformina añadida al medio isotónico que contiene las mitocondrias consigue inhibir el consumo de oxígeno utilizando como sustrato el glutamato/malato. Sin embargo, este efecto no se observa cuando se utiliza succinato como sustrato. Por lo tanto, no obstante sean necesarios más experimentos para confirmar este efecto, nuestros primeros datos apuntan a que el efecto de la metformina es un efecto directo, descartando así las hipótesis del grupo de Leverve.

De los datos bioenergéticos que se reflejan en esta memoria hay que hacer especial hincapié sobre el efecto del agente desacoplante FCCP. Como se ha mencionado anteriormente, este desacoplante facilita la entrada de protones hacia la matriz hasta provocar un colapso del potencial de membrana. Por tanto, se suele utilizar en bioenergética como parámetro que indica la capacidad máxima respiratoria de las mitocondrias. Analizando la respiración máxima de las mitocondrias de los adipocitos blancos observamos con gran interés que tanto las mitocondrias en presencia de metformina como las mitocondrias control alcanzaban valores de consumo de oxígeno muy próximos (Fig. R20, E de los Resultados). Este dato apuntaba claramente a que el

FCCP puede revertir el efecto de la metformina sobre la respiración. Para estudiar más a fondo este resultado, se comparó el efecto de la rotenona sobre la respiración mitocondrial de los adipocitos blancos. En este caso se buscó una inhibición de la respiración que fuese parecida a la observada en presencia de metformina. Para ello se utilizó una concentración muy baja de rotenona (4 nM). Una vez conseguido el efecto deseado, se comparó el efecto del FCCP en las distintas condiciones. Los datos que se obtuvieron se reflejan en la figura R22 de los Resultados, donde se aprecia que el efecto de la rotenona y el efecto de la metformina son diferentes. En el caso de la rotenona, la respiración mitocondrial seguía estando inhibida en presencia de FCCP con respecto al control. Sin embargo, el efecto de la metformina desaparecía con el desacoplante. En la figura R22 C se observa que la estimulación por FCCP en presencia de metformina es similar a los adipocitos control y se estima 3 veces mayor que en las muestras tratadas con rotenona. A raíz de estos datos, una posible respuesta que se puede abordar está relacionada con el cambio del $\Delta\psi$ y es, además, compatible con el carácter catiónico de la metformina. Se ha observado que este fármaco se acumula en la matriz, siendo una molécula cargada positivamente e interacciona desde la cara matricial con el complejo I (Owen, Doran et al. 2000). En presencia de FCCP el aumento de H^+ en la matriz provoca que el potencial electroquímico de protones se disipe hasta colapsarse. Por tanto, podría ser que este cambio de carga iónica es suficiente para revertir el efecto de la metformina sobre la respiración mitocondrial.

Cabe destacar que en la presente tesis se ha observado que no sólo el FCCP, sino también el palmitato consigue revertir el efecto de la metformina sobre la respiración mitocondrial. Como se aprecia en la figura R20, C de los Resultados, la respiración mitocondrial se encuentra inhibida en presencia de metformina con respecto a los adipocitos control. Sin embargo, en la figura R15, C de los Resultados, se observa que los valores de consumo de oxígeno en presencia de palmitato son muy similares entre los adipocitos tratados con metformina y los adipocitos control. Durante la β -oxidación se forman 7 moléculas de NADH y 7 moléculas de $FADH_2$ (además de 8 moléculas de acetil-CoA), por lo que los electrones son cedidos tanto al complejo I como al complejo II. Si durante la oxidación del palmitato la metformina inhibiera la actividad del complejo I, se debería observar un menor consumo de oxígeno, puesto que el NADH no puede ceder sus electrones a la NADH deshidrogenasa. Sin embargo, en este caso, no se detecta ninguna inhibición de la respiración, por lo que deducimos que la actividad del complejo I no se encuentra inhibida. De acuerdo con nuestros datos, citamos el trabajo de Davidoff, que estudió el efecto de la fenetilbiguanida (derivado de la guanidina) en el metabolismo del piruvato y de ácidos grasos de cadena larga en mitocondrias aisladas a partir de corazón de conejillos de india (Davidoff 1968). Este estudio reveló que en presencia de ácidos grasos la respiración mitocondrial es similar entre las mitocondrias control y las tratadas con

fenetilbiguanida. Sin embargo, en presencia de piruvato se detecta una menor actividad respiratoria en las mitocondrias tratadas con fenetilbiguanida. Por tanto, este estudio respalda nuestras observaciones y apunta a que los ácidos grasos, al igual que el FCCP, consiguen revertir el efecto de la metformina.

CONCLUSIONES

1. El tratamiento *in vivo* de ratones C57/BL6 con metformina induce la expresión de UCP2 en el tejido adiposo blanco.
2. El tratamiento con metformina de las células de la línea adipocitaria 3T3-L1 induce la expresión de UCP2.
3. La metformina inhibe la respiración mitocondrial en la línea adipocitaria 3T3-L1, siendo el efecto significativo a partir de los 30 minutos. Se ha propuesto que la metformina inhibe el complejo I de la cadena respiratoria mitocondrial, pero, a diferencia de la rotenona, la inhibición por metformina se revierte con un agente desacoplante o con ácidos grasos.
4. La metformina provoca estrés oxidativo en la línea adipocitaria 3T3-L1.
5. La inducción de la UCP2 está relacionada con el estrés oxidativo, ya que, en presencia de un antioxidante, los niveles de UCP2 no varían.
6. La metformina activa la AMPK, inhibiendo la lipogénesis e induciendo la lipólisis. La activación de la AMPK es rápida y es previa a la bajada de los niveles de ATP. La presencia de un antioxidante no previene la activación de la AMPK.

BIBLIOGRAFÍA

- Abbasi, F., M. Carantoni, et al. (1998). "Further evidence for a central role of adipose tissue in the antihyperglycemic effect of metformin." *Diabetes Care* **21**(8): 1301-5.
- AdamVizi, V. and C. Chinopoulos (2006). "Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species." *Trends Pharmacol.Sci.* **27**(12): 639-645.
- Affourtit, C. and M. D. Brand (2008). "On the role of uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells." *Biochim Biophys Acta* **1777**(7-8): 973-9.
- Ahima, R. S., C. B. Saper, et al. (2000). "Leptin regulation of neuroendocrine systems." *Front Neuroendocrinol* **21**(3): 263-307.
- Alessi, M. C., F. Peiretti, et al. (1997). "Production of plasminogen activator inhibitor 1 by human adipose tissue: possible link between visceral fat accumulation and vascular disease." *Diabetes* **46**(5): 860-7.
- Alexandre, K. B., A. M. Smit, et al. (2008). "Metformin inhibits intracellular lipid accumulation in the murine pre-adipocyte cell line, 3T3-L1." *Diabetes Obes Metab* **10**(8): 688-90.
- Aljada, A., K. A. Shah, et al. (2009). "Peroxisome proliferator-activated receptor agonists: do they increase cardiovascular risk?" *PPAR Res* **2009**: 460764.
- An, Z., H. Wang, et al. (2007). "Nicotine-induced activation of AMP-activated protein kinase inhibits fatty acid synthase in 3T3L1 adipocytes: a role for oxidant stress." *J Biol Chem* **282**(37): 26793-801.
- Andrews, Z. B. and T. L. Horvath (2009). "Uncoupling protein-2 regulates lifespan in mice." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **296**(4): E621-7.
- Antinozzi, P. A., H. Ishihara, et al. (2002). "Mitochondrial metabolism sets the maximal limit of fuel-stimulated insulin secretion in a model pancreatic beta cell: a survey of four fuel secretagogues." *J Biol Chem* **277**(14): 11746-55.
- Argaud, D., H. Roth, et al. (1993). "Metformin decreases gluconeogenesis by enhancing the pyruvate kinase flux in isolated rat hepatocytes." *Eur J Biochem* **213**(3): 1341-8.
- Arita, Y., S. Kihara, et al. (1999). "Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity." *Biochem Biophys Res Commun* **257**(1): 79-83.
- Arner, P. (2000). "Obesity--a genetic disease of adipose tissue?" *Br J Nutr* **83 Suppl 1**: S9-16.
- Arsenijevic, D., H. Onuma, et al. (2000). "Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production." *Nat Genet* **26**(4): 435-9.
- Bai, Y., H. Onuma, et al. (2005). "Persistent nuclear factor-kappa B activation in Ucp2^{-/-} mice leads to enhanced nitric oxide and inflammatory cytokine production." *J Biol Chem* **280**(19): 19062-9.
- Bailey, C. J. (2008). "Metformin: effects on micro and macrovascular complications in type 2 diabetes." *Cardiovasc Drugs Ther* **22**(3): 215-24.
- Bailey, C. J. and C. Day (1989). "Traditional plant medicines as treatments for diabetes." *Diabetes Care* **12**(8): 553-64.
- Bailey, C. J. and R. C. Turner (1996). "Metformin." *N Engl J Med* **334**(9): 574-9.
- Bailey, C. J., C. Wilcock, et al. (2008). "Metformin and the intestine." *Diabetologia* **51**(8): 1552-3.
- Barbera, M. J., A. Schluter, et al. (2001). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activates transcription of the brown fat uncoupling protein-1 gene. A link between regulation of the thermogenic and lipid oxidation pathways in the brown fat cell." *J Biol Chem* **276**(2): 1486-93.

- Batandier, C., B. Guigas, et al. (2006). "The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin." *J Bioenerg Biomembr* **38**(1): 33-42.
- Baus, D., K. Heermeier, et al. (2008). "Identification of a novel AS160 splice variant that regulates GLUT4 translocation and glucose-uptake in rat muscle cells." *Cell Signal* **20**(12): 2237-46.
- Bechmann, I., S. Diano, et al. (2002). "Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury." *Biochem Pharmacol* **64**(3): 363-7.
- Beg, Z. H., D. W. Allmann, et al. (1973). "Modulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity with cAMP and with protein fractions of rat liver cytosol." *Biochem Biophys Res Commun* **54**(4): 1362-9.
- Berentzen, T., L. T. Dalgaard, et al. (2005). "Interactions between physical activity and variants of the genes encoding uncoupling proteins -2 and -3 in relation to body weight changes during a 10-y follow-up." *Int J Obes (Lond)* **29**(1): 93-9.
- Berg, A. H., T. P. Combs, et al. (2001). "The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action." *Nat Med* **7**(8): 947-53.
- Blazquez, C., M. J. Geelen, et al. (2001). "The AMP-activated protein kinase prevents ceramide synthesis de novo and apoptosis in astrocytes." *FEBS Lett* **489**(2-3): 149-53.
- Blumcke, I., W. Züschratter, et al. (1999). "Cellular pathology of hilar neurons in Ammon's horn sclerosis." *J Comp Neurol* **414**(4): 437-53.
- Boden, G. and G. I. Shulman (2002). "Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction." *Eur J Clin Invest* **32 Suppl 3**: 14-23.
- Boden, G. and M. Zhang (2006). "Recent findings concerning thiazolidinediones in the treatment of diabetes." *Expert Opin Investig Drugs* **15**(3): 243-50.
- Borecky, J. and A. E. Vercesi (2005). "Plant uncoupling mitochondrial protein and alternative oxidase: energy metabolism and stress." *Biosci Rep* **25**(3-4): 271-86.
- Boss, O., S. Samec, et al. (1997). "Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression." *FEBS Lett* **408**(1): 39-42.
- Bouillaud, F. (2009). "UCP2, not a physiologically relevant uncoupler but a glucose sparing switch impacting ROS production and glucose sensing." *Biochim Biophys Acta* **1787**(5): 377-83.
- Bouillaud, F., I. Arechaga, et al. (1994). "A sequence related to a DNA recognition element is essential for the inhibition by nucleotides of proton transport through the mitochondrial uncoupling protein." *Embo J* **13**(8): 1990-7.
- Bouillaud, F., L. Casteilla, et al. (1992). "A conserved domain in mitochondrial transporters is homologous to a zinc-finger knuckle of nuclear hormone receptors." *Mol Biol Evol* **9**(5): 970-5.
- Bouillaud, F., E. Couplan, et al. (2001). "Homologues of the uncoupling protein from brown adipose tissue (UCP1): UCP2, UCP3, BMCP1 and UCP4." *Biochim Biophys Acta* **1504**(1): 107-19.
- Boveris, A. and E. Cadenas (1975). "Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration." *FEBS Lett* **54**(3): 311-4.
- Boyle, P. J. (2004). "What are the effects of peroxisome proliferator-activated receptor agonists on adiponectin, tumor necrosis factor-alpha, and other cytokines in insulin resistance?" *Clin Cardiol* **27**(7 Suppl 4): IV11-6.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brand, M. D., C. Affourtit, et al. (2004). "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins." Free Radic Biol Med **37**(6): 755-67.
- Brand, M. D., J. L. Pakay, et al. (2005). "The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content." Biochem J **392**(Pt 2): 353-62.
- Brookes, P. S. (2005). "Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an odd couple." Free Radic Biol Med **38**(1): 12-23.
- Brookes, P. S., N. Parker, et al. (2008). "UCPs--unlikely calcium porters." Nat Cell Biol **10**(11): 1235-7; author reply 1237-40.
- Brunmair, B., K. Staniek, et al. (2004). "Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions?" Diabetes **53**(4): 1052-9.
- Cacicedo, J. M., S. Benjachareowong, et al. (2005). "Palmitate-induced apoptosis in cultured bovine retinal pericytes: roles of NAD(P)H oxidase, oxidant stress, and ceramide." Diabetes **54**(6): 1838-45.
- Cannon, B. and J. Nedergaard (2004). "Brown adipose tissue: function and physiological significance." Physiol Rev **84**(1): 277-359.
- Cannon, B., I. G. Shabalina, et al. (2006). "Uncoupling proteins: a role in protection against reactive oxygen species--or not?" Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 449-58.
- Cassard-Doulcier, A. M., C. Gelly, et al. (1993). "Tissue-specific and beta-adrenergic regulation of the mitochondrial uncoupling protein gene: control by cis-acting elements in the 5'-flanking region." Mol Endocrinol **7**(4): 497-506.
- Ceddia, R. B., W. N. William, Jr., et al. (2000). "Leptin stimulates uncoupling protein-2 mRNA expression and Krebs cycle activity and inhibits lipid synthesis in isolated rat white adipocytes." Eur J Biochem **267**(19): 5952-8.
- Cianflone, K., X. J. Zhang, et al. (1997). "Plasma acylation-stimulating protein in coronary artery disease." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(7): 1239-44.
- Ciaraldi, T. P., A. P. Kong, et al. (2002). "Regulation of glucose transport and insulin signaling by troglitazone or metformin in adipose tissue of type 2 diabetic subjects." Diabetes **51**(1): 30-6.
- Cohen, A. W., R. Hnasko, et al. (2004). "Role of caveolae and caveolins in health and disease." Physiol Rev **84**(4): 1341-79.
- Collins, P., C. Jones, et al. (2005). "Increased expression of uncoupling protein 2 in HepG2 cells attenuates oxidative damage and apoptosis." Liver Int **25**(4): 880-7.
- Couplan, E., M. del Mar Gonzalez-Barroso, et al. (2002). "No evidence for a basal, retinoic, or superoxide-induced uncoupling activity of the uncoupling protein 2 present in spleen or lung mitochondria." J Biol Chem **277**(29): 26268-75.
- Chan, C. B., D. De Leo, et al. (2001). "Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action." Diabetes **50**(6): 1302-10.
- Chan, C. B. and N. Kashemsant (2006). "Regulation of insulin secretion by uncoupling protein." Biochem Soc Trans **34**(Pt 5): 802-5.
- Chappell, J. B. (1963). "The effect of alkylguanidines on mitochondrial metabolism." J Biol Chem **238**: 410-7.

- Chen, H. H., W. J. Lee, et al. (2007). "Ala55Val polymorphism on UCP2 gene predicts greater weight loss in morbidly obese patients undergoing gastric banding." *Obes Surg* **17**(7): 926-33.
- Chevillotte, E., M. Giralt, et al. (2007). "Uncoupling protein-2 controls adiponectin gene expression in adipose tissue through the modulation of reactive oxygen species production." *Diabetes* **56**(4): 1042-50.
- D'Adamo, M., L. Perego, et al. (2004). "The -866A/A genotype in the promoter of the human uncoupling protein 2 gene is associated with insulin resistance and increased risk of type 2 diabetes." *Diabetes* **53**(7): 1905-10.
- Dalle-Donne, I., R. Rossi, et al. (2006). "Biomarkers of oxidative damage in human disease." *Clin Chem* **52**(4): 601-23.
- Daval, M., F. Diot-Dupuy, et al. (2005). "Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes." *J Biol Chem* **280**(26): 25250-7.
- Daval, M., F. Foulle, et al. (2006). "Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue." *J Physiol* **574**(Pt 1): 55-62.
- Davidoff, F. (1968). "Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function. I. Phenethylbiguanide inhibition of respiration in mitochondria from guinea pig and rat tissues." *J Clin Invest* **47**(10): 2331-43.
- Davidoff, F. (1971). "Effects of guanidine derivatives on mitochondrial function. 3. The mechanism of phenethylbiguanide accumulation and its relationship to in vitro respiratory inhibition." *J Biol Chem* **246**(12): 4017-27.
- De Souza, C. T., E. P. Araujo, et al. (2007). "Inhibition of UCP2 expression reverses diet-induced diabetes mellitus by effects on both insulin secretion and action." *Faseb J* **21**(4): 1153-63.
- DeFronzo, R. A. (1999). "Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus." *Ann Intern Med* **131**(4): 281-303.
- Degasperi, G. R., T. Romanatto, et al. (2008). "UCP2 protects hypothalamic cells from TNF-alpha-induced damage." *FEBS Lett* **582**(20): 3103-10.
- Deierborg, T., T. Wieloch, et al. (2008). "Overexpression of UCP2 protects thalamic neurons following global ischemia in the mouse." *J Cereb Blood Flow Metab* **28**(6): 1186-95.
- del Arco, A. and J. Satrustegui (2004). "Identification of a novel human subfamily of mitochondrial carriers with calcium-binding domains." *J Biol Chem* **279**(23): 24701-13.
- DeLuca, M. and W. D. McElroy (1974). "Kinetics of the firefly luciferase catalyzed reactions." *Biochemistry* **13**(5): 921-5.
- DeLuca, M. and W. D. McElroy (1984). "Two kinetically distinguishable ATP sites in firefly luciferase." *Biochem Biophys Res Commun* **123**(2): 764-70.
- Derdak, Z., P. Fulop, et al. (2006). "Enhanced colon tumor induction in uncoupling protein-2 deficient mice is associated with NF-kappaB activation and oxidative stress." *Carcinogenesis* **27**(5): 956-61.
- Derdak, Z., N. M. Mark, et al. (2008). "The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells." *Cancer Res* **68**(8): 2813-9.
- Detaille, D., B. Guigas, et al. (2002). "Obligatory role of membrane events in the regulatory effect of metformin on the respiratory chain function." *Biochem Pharmacol* **63**(7): 1259-72.
- Diano, S., R. T. Matthews, et al. (2003). "Uncoupling protein 2 prevents neuronal death including that occurring during seizures: a mechanism for preconditioning." *Endocrinology* **144**(11): 5014-21.

- Diano, S., H. F. Urbanski, et al. (2000). "Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in the nonhuman primate brain and pituitary." *Endocrinology* **141**(11): 4226-38.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* **82**(1): 47-95.
- Duval, C., A. Negre-Salvayre, et al. (2002). "Increased reactive oxygen species production with antisense oligonucleotides directed against uncoupling protein 2 in murine endothelial cells." *Biochem Cell Biol* **80**(6): 757-64.
- Echtay, K. S. (2007). "Mitochondrial uncoupling proteins--what is their physiological role?" *Free Radic Biol Med* **43**(10): 1351-71.
- Echtay, K. S., T. C. Esteves, et al. (2003). "A signalling role for 4-hydroxy-2-nonenal in regulation of mitochondrial uncoupling." *Embo J* **22**(16): 4103-10.
- Echtay, K. S., D. Roussel, et al. (2002). "Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins." *Nature* **415**(6867): 96-9.
- El-Mir, M. Y., V. Nogueira, et al. (2000). "Dimethylbiguanide inhibits cell respiration via an indirect effect targeted on the respiratory chain complex I." *J Biol Chem* **275**(1): 223-8.
- Engelman, J. A., M. P. Lisanti, et al. (1998). "Specific inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase block 3T3-L1 adipogenesis." *J Biol Chem* **273**(48): 32111-20.
- Esterbauer, H., C. Schneitler, et al. (2001). "A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans." *Nat Genet* **28**(2): 178-83.
- Fato, R., C. Bergamini, et al. (2008). "Mitochondrial production of reactive oxygen species: role of complex I and quinone analogues." *Biofactors* **32**(1-4): 31-9.
- Festa, A., R. D'Agostino, Jr., et al. (2001). "The relation of body fat mass and distribution to markers of chronic inflammation." *Int J Obes Relat Metab Disord* **25**(10): 1407-15.
- Fleury, C., B. Mignotte, et al. (2002). "Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling." *Biochimie* **84**(2-3): 131-41.
- Fleury, C., M. Neverova, et al. (1997). "Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia." *Nat Genet* **15**(3): 269-72.
- Foretz, M., N. Ancellin, et al. (2005). "Short-term overexpression of a constitutively active form of AMP-activated protein kinase in the liver leads to mild hypoglycemia and fatty liver." *Diabetes* **54**(5): 1331-9.
- Frei, B., R. Stocker, et al. (1990). "Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma." *Adv Exp Med Biol* **264**: 155-63.
- Fridovich, I. (1997). "Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters." *J Biol Chem* **272**(30): 18515-7.
- Fryer, L. G., A. Parbu-Patel, et al. (2002). "The Anti-diabetic drugs rosiglitazone and metformin stimulate AMP-activated protein kinase through distinct signaling pathways." *J Biol Chem* **277**(28): 25226-32.
- Galetti, S., A. Sarre, et al. (2009). "Fatty acids do not activate UCP2 in pancreatic beta cells: comparison with UCP1." *Pflugers Arch* **457**(4): 931-40.
- Gargiulo, P., D. Caccese, et al. (2002). "Metformin decreases platelet superoxide anion production in diabetic patients." *Diabetes Metab Res Rev* **18**(2): 156-9.
- Garlid, K. D., D. E. Orosz, et al. (1996). "On the mechanism of fatty acid-induced proton transport by mitochondrial uncoupling protein." *J Biol Chem* **271**(5): 2615-20.
- Genova, M. L., M. M. Pich, et al. (2003). "Mitochondrial production of oxygen radical species and the role of Coenzyme Q as an antioxidant." *Exp Biol Med (Maywood)* **228**(5): 506-13.

- Gettings, S. D., J. E. Reeve, et al. (1988). "Possible role of intracellular Ca^{2+} in the toxicity of phenformin." *Biochem Pharmacol* **37**(2): 281-9.
- Giardina, T. M., J. H. Steer, et al. (2008). "Uncoupling protein-2 accumulates rapidly in the inner mitochondrial membrane during mitochondrial reactive oxygen stress in macrophages." *Biochim Biophys Acta* **1777**(2): 118-29.
- Giorgino, F., L. Laviola, et al. (2005). "Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies." *Acta Physiol Scand* **183**(1): 13-30.
- Gluck, M. R., S. K. Youngster, et al. (1994). "Studies on the characterization of the inhibitory mechanism of 4'-alkylated 1-methyl-4-phenylpyridinium and phenylpyridine analogues in mitochondria and electron transport particles." *J Neurochem* **63**(2): 655-61.
- Glueck, C. J., R. N. Fontaine, et al. (2001). "Metformin reduces weight, centripetal obesity, insulin, leptin, and low-density lipoprotein cholesterol in nondiabetic, morbidly obese subjects with body mass index greater than 30." *Metabolism* **50**(7): 856-61.
- Gonzalez-Barroso, M. M., C. Fleury, et al. (1999). "Structural and functional study of a conserved region in the uncoupling protein UCP1: the three matrix loops are involved in the control of transport." *J Mol Biol* **292**(1): 137-49.
- Guo, J. J., Y. J. Liu, et al. (2005). "Linkage exclusion analysis of two candidate regions on chromosomes 7 and 11: leptin and UCP2/UCP3 are not QTLs for obesity in US Caucasians." *Biochem Biophys Res Commun* **332**(2): 602-8.
- Habinowski, S. A. and L. A. Witters (2001). "The effects of AICAR on adipocyte differentiation of 3T3-L1 cells." *Biochem Biophys Res Commun* **286**(5): 852-6.
- Hagen, T. and B. B. Lowell (2000). "Chimeric proteins between UCP1 and UCP3: the middle third of UCP1 is necessary and sufficient for activation by fatty acids." *Biochem Biophys Res Commun* **276**(2): 642-8.
- Halliwell, B. (1999). "Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)." *Free Radic Res* **31**(4): 261-72.
- Halliwell, B. (2007). "Oxidative stress and cancer: have we moved forward?" *Biochem J* **401**(1): 1-11.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* **100**(1): 57-70.
- Hardie, D. G., S. A. Hawley, et al. (2006). "AMP-activated protein kinase--development of the energy sensor concept." *J Physiol* **574**(Pt 1): 7-15.
- Harper, M. E., A. Antoniou, et al. (2002). "Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells." *Faseb J* **16**(12): 1550-7.
- Hawley, S. A., A. E. Gadalla, et al. (2002). "The antidiabetic drug metformin activates the AMP-activated protein kinase cascade via an adenine nucleotide-independent mechanism." *Diabetes* **51**(8): 2420-5.
- Hawley, S. A., D. A. Pan, et al. (2005). "Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase." *Cell Metab* **2**(1): 9-19.
- He, L., A. Sabet, et al. (2009). "Metformin and insulin suppress hepatic gluconeogenesis through phosphorylation of CREB binding protein." *Cell* **137**(4): 635-46.
- Heaton, G. M., R. J. Wagenvoort, et al. (1978). "Brown-adipose-tissue mitochondria: photoaffinity labelling of the regulatory site of energy dissipation." *Eur J Biochem* **82**(2): 515-21.
- Hickson-Bick, D. L., L. M. Buja, et al. (2000). "Palmitate-mediated alterations in the fatty acid metabolism of rat neonatal cardiac myocytes." *J Mol Cell Cardiol* **32**(3): 511-9.

- Himms-Hagen, J. and M. E. Harper (2001). "Physiological role of UCP3 may be export of fatty acids from mitochondria when fatty acid oxidation predominates: an hypothesis." *Exp Biol Med (Maywood)* **226**(2): 78-84.
- Holmgren, A. (2000). "Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems." *Antioxid Redox Signal* **2**(4): 811-20.
- Holmgren, A. and M. Bjornstedt (1995). "Thioredoxin and thioredoxin reductase." *Methods Enzymol* **252**: 199-208.
- Hong, Y., B. D. Fink, et al. (2001). "Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells." *Endocrinology* **142**(1): 249-56.
- Horimoto, M., P. Fulop, et al. (2004). "Uncoupling protein-2 deficiency promotes oxidant stress and delays liver regeneration in mice." *Hepatology* **39**(2): 386-92.
- Horimoto, M., M. B. Resnick, et al. (2004). "Expression of uncoupling protein-2 in human colon cancer." *Clin Cancer Res* **10**(18 Pt 1): 6203-7.
- Hotamisligil, G. S. (2003). "Inflammatory pathways and insulin action." *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3**: S53-5.
- Hotta, K., T. Funahashi, et al. (2000). "Plasma concentrations of a novel, adipose-specific protein, adiponectin, in type 2 diabetic patients." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(6): 1595-9.
- Hughes, D. A., M. Jastroch, et al. (2009). "Molecular evolution of UCP1 and the evolutionary history of mammalian non-shivering thermogenesis." *BMC Evol Biol* **9**: 4.
- Hundal, R. S., M. Krssak, et al. (2000). "Mechanism by which metformin reduces glucose production in type 2 diabetes." *Diabetes* **49**(12): 2063-9.
- Hurtaud, C., C. Gelly, et al. (2006). "Translation control of UCP2 synthesis by the upstream open reading frame." *Cell Mol Life Sci* **63**(15): 1780-9.
- Hussain, S. P., L. J. Hofseth, et al. (2003). "Radical causes of cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(4): 276-85.
- Huypens, P., E. Quartier, et al. (2005). "Metformin reduces adiponectin protein expression and release in 3T3-L1 adipocytes involving activation of AMP activated protein kinase." *Eur J Pharmacol* **518**(2-3): 90-5.
- Ikeda, T., K. Iwata, et al. (2000). "Inhibitory effect of metformin on intestinal glucose absorption in the perfused rat intestine." *Biochem Pharmacol* **59**(7): 887-90.
- Jaburek, M. and K. D. Garlid (2003). "Reconstitution of recombinant uncoupling proteins: UCP1, -2, and -3 have similar affinities for ATP and are unaffected by coenzyme Q10." *J Biol Chem* **278**(28): 25825-31.
- Jaburek, M., M. Varecha, et al. (1999). "Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3." *J Biol Chem* **274**(37): 26003-7.
- Janoff, A. (1964). "Alterations in Lysosomes (Intracellular Enzymes) During Shock; Effects of Preconditioning (Tolerance) and Protective Drugs." *Int Anesthesiol Clin* **2**: 251-69.
- Jastroch, M., K. Withers, et al. (2004). "Uncoupling protein 2 and 3 in marsupials: identification, phylogeny, and gene expression in response to cold and fasting in *Antechinus flavipes*." *Physiol Genomics* **17**(2): 130-9.
- Jimenez-Jimenez, J., A. Ledesma, et al. (2006). "Fatty acid activation of the uncoupling proteins requires the presence of the central matrix loop from UCP1." *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1292-6.
- Jimenez-Jimenez, J., R. Zardoya, et al. (2006). "Evolutionarily distinct residues in the uncoupling protein UCP1 are essential for its characteristic basal proton conductance." *J Mol Biol* **359**(4): 1010-22.

- Joseph, J. W., V. Koshkin, et al. (2004). "Free fatty acid-induced beta-cell defects are dependent on uncoupling protein 2 expression." *J Biol Chem* **279**(49): 51049-56.
- Joseph, J. W., V. Koshkin, et al. (2002). "Uncoupling protein 2 knockout mice have enhanced insulin secretory capacity after a high-fat diet." *Diabetes* **51**(11): 3211-9.
- Kahn, B. B., T. Alquier, et al. (2005). "AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism." *Cell Metab* **1**(1): 15-25.
- Kajimoto, Y. and H. Kaneto (2004). "Role of oxidative stress in pancreatic beta-cell dysfunction." *Ann N Y Acad Sci* **1011**: 168-76.
- Kane, S., H. Sano, et al. (2002). "A method to identify serine kinase substrates. Akt phosphorylates a novel adipocyte protein with a Rab GTPase-activating protein (GAP) domain." *J Biol Chem* **277**(25): 22115-8.
- Kashemsant, N. and C. B. Chan (2006). "Impact of uncoupling protein-2 overexpression on proinsulin processing." *J Mol Endocrinol* **37**(3): 517-26.
- Khailova, L. S., E. A. Prikhodko, et al. (2006). "Participation of ATP/ADP antiporter in oleate- and oleate hydroperoxide-induced uncoupling suppressed by GDP and carboxyatractylate." *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1324-9.
- Kim-Han, J. S. and L. L. Dugan (2005). "Mitochondrial uncoupling proteins in the central nervous system." *Antioxid Redox Signal* **7**(9-10): 1173-81.
- Kim, J. E., Y. W. Kim, et al. (2008). "AMP-activated protein kinase activation by 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside (AICAR) inhibits palmitate-induced endothelial cell apoptosis through reactive oxygen species suppression." *J Pharmacol Sci* **106**(3): 394-403.
- Kim, W. H., J. W. Lee, et al. (2007). "AICAR potentiates ROS production induced by chronic high glucose: roles of AMPK in pancreatic beta-cell apoptosis." *Cell Signal* **19**(4): 791-805.
- Kim, Y. D., K. G. Park, et al. (2008). "Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis through AMP-activated protein kinase-dependent regulation of the orphan nuclear receptor SHP." *Diabetes* **57**(2): 306-14.
- Kirchgessner, T. G., K. T. Uysal, et al. (1997). "Tumor necrosis factor-alpha contributes to obesity-related hyperleptinemia by regulating leptin release from adipocytes." *J Clin Invest* **100**(11): 2777-82.
- Kirichok, Y., G. Krapivinsky, et al. (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." *Nature* **427**(6972): 360-4.
- Kirpichnikov, D., S. I. McFarlane, et al. (2002). "Metformin: an update." *Ann Intern Med* **137**(1): 25-33.
- Kitagawa, K., M. Matsumoto, et al. (1990). "'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain." *Brain Res* **528**(1): 21-4.
- Klingenberg, M. (1988). "Nucleotide binding to uncoupling protein. Mechanism of control by protonation." *Biochemistry* **27**(2): 781-91.
- Klingenberg, M. and E. Winkler (1985). "The reconstituted isolated uncoupling protein is a membrane potential driven H⁺ translocator." *Embo J* **4**(12): 3087-92.
- Koo, S. H., L. Flechner, et al. (2005). "The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism." *Nature* **437**(7062): 1109-11.
- Kopecky, J., G. Clarke, et al. (1995). "Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity." *J Clin Invest* **96**(6): 2914-23.
- Kopecky, J., M. Rossmeisl, et al. (2004). "Energy metabolism of adipose tissue--physiological aspects and target in obesity treatment." *Physiol Res* **53 Suppl 1**: S225-32.

- Kopf, M., H. Baumann, et al. (1994). "Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice." *Nature* **368**(6469): 339-42.
- Kosuge, K., M. Soma, et al. (2008). "Human uncoupling protein 2 and 3 genes are associated with obesity in Japanese." *Endocrine* **34**(1-3): 87-95.
- Krauss, S., C. Y. Zhang, et al. (2005). "The mitochondrial uncoupling-protein homologues." *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**(3): 248-61.
- Krauss, S., C. Y. Zhang, et al. (2003). "Superoxide-mediated activation of uncoupling protein 2 causes pancreatic beta cell dysfunction." *J Clin Invest* **112**(12): 1831-42.
- Krempler, F., H. Esterbauer, et al. (2002). "A functional polymorphism in the promoter of UCP2 enhances obesity risk but reduces type 2 diabetes risk in obese middle-aged humans." *Diabetes* **51**(11): 3331-5.
- Kukidome, D., T. Nishikawa, et al. (2006). "Activation of AMP-activated protein kinase reduces hyperglycemia-induced mitochondrial reactive oxygen species production and promotes mitochondrial biogenesis in human umbilical vein endothelial cells." *Diabetes* **55**(1): 120-7.
- Kunji, E. R. (2004). "The role and structure of mitochondrial carriers." *FEBS Lett* **564**(3): 239-44.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lameloise, N., P. Muzzin, et al. (2001). "Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion?" *Diabetes* **50**(4): 803-9.
- Laybutt, D. R., A. Sharma, et al. (2002). "Genetic regulation of metabolic pathways in beta-cells disrupted by hyperglycemia." *J Biol Chem* **277**(13): 10912-21.
- Le Bras, M., M. V. Clement, et al. (2005). "Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death." *Histol Histopathol* **20**(1): 205-19.
- Ledesma, A., M. G. de Lacoba, et al. (2002). "Modeling the transmembrane arrangement of the uncoupling protein UCP1 and topological considerations of the nucleotide-binding site." *J Bioenerg Biomembr* **34**(6): 473-86.
- Ledesma, A., M. G. de Lacoba, et al. (2002). "The mitochondrial uncoupling proteins." *Genome Biol* **3**(12): REVIEWS3015.
- Lee, F. Y., Y. Li, et al. (1999). "Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver." *Hepatology* **29**(3): 677-87.
- Lee, Y. S., W. S. Kim, et al. (2006). "Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states." *Diabetes* **55**(8): 2256-64.
- Leverve, X. M., B. Guigas, et al. (2003). "Mitochondrial metabolism and type-2 diabetes: a specific target of metformin." *Diabetes Metab* **29**(4 Pt 2): 6S88-94.
- Li, J., Z. Zeng, et al. (2007). "Neuroprotective effects of adenosine monophosphate-activated protein kinase inhibition and gene deletion in stroke." *Stroke* **38**(11): 2992-9.
- Li, L. X., F. Skorpen, et al. (2001). "Uncoupling protein-2 participates in cellular defense against oxidative stress in clonal beta-cells." *Biochem Biophys Res Commun* **282**(1): 273-7.
- Li, Y., T. T. Huang, et al. (1995). "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase." *Nat Genet* **11**(4): 376-81.
- Lihn, A. S., N. Jessen, et al. (2004). "AICAR stimulates adiponectin and inhibits cytokines in adipose tissue." *Biochem Biophys Res Commun* **316**(3): 853-8.

- Lihn, A. S., T. Ostergard, et al. (2003). "Adiponectin expression in adipose tissue is reduced in first-degree relatives of type 2 diabetic patients." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **284**(2): E443-8.
- Lisanti, M. P., P. E. Scherer, et al. (1994). "Caveolae, caveolin and caveolin-rich membrane domains: a signalling hypothesis." *Trends Cell Biol* **4**(7): 231-5.
- Lochhead, P. A., I. P. Salt, et al. (2000). "5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase." *Diabetes* **49**(6): 896-903.
- Mahrouf, M., N. Ouslimani, et al. (2006). "Metformin reduces angiotensin-mediated intracellular production of reactive oxygen species in endothelial cells through the inhibition of protein kinase C." *Biochem Pharmacol* **72**(2): 176-83.
- Marsin, A. S., C. Bouzin, et al. (2002). "The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase." *J Biol Chem* **277**(34): 30778-83.
- Martin, B. R. and R. M. Denton (1970). "The intracellular localization of enzymes in white-adipose-tissue fat-cells and permeability properties of fat-cell mitochondria. Transfer of acetyl units and reducing power between mitochondria and cytoplasm." *Biochem J* **117**(5): 861-77.
- Mattiasson, G., M. Shamloo, et al. (2003). "Uncoupling protein-2 prevents neuronal death and diminishes brain dysfunction after stroke and brain trauma." *Nat Med* **9**(8): 1062-8.
- Mattiasson, G. and P. G. Sullivan (2006). "The emerging functions of UCP2 in health, disease, and therapeutics." *Antioxid Redox Signal* **8**(1-2): 1-38.
- McCord, J. M. and I. Fridovich (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein)." *J Biol Chem* **244**(22): 6049-55.
- McCormack, J. G., A. P. Halestrap, et al. (1990). "Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism." *Physiol Rev* **70**(2): 391-425.
- McGarry, J. D. (2002). "Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes." *Diabetes* **51**(1): 7-18.
- McQuaid, T. S., M. C. Saleh, et al. (2006). "cAMP-mediated signaling normalizes glucose-stimulated insulin secretion in uncoupling protein-2 overexpressing beta-cells." *J Endocrinol* **190**(3): 669-80.
- Medvedev, A. V., J. Robidoux, et al. (2002). "Regulation of the uncoupling protein-2 gene in INS-1 beta-cells by oleic acid." *J Biol Chem* **277**(45): 42639-44.
- Meier, C. A. and S. Thalmann (2007). "[White adipose tissue, inflammation and atherosclerosis]." *Bull Acad Natl Med* **191**(4-5): 897-908; discussion 908-10.
- Minokoshi, Y., Y. B. Kim, et al. (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." *Nature* **415**(6869): 339-43.
- Misra, P. (2008). "AMP activated protein kinase: a next generation target for total metabolic control." *Expert Opin Ther Targets* **12**(1): 91-100.
- Mitchell (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature*. **191**: 423-427.
- Mitchell (1976). Vectorial chemistry and the molecular mechanism of chemiosmotic coupling. *Biochemical Society Transactions*. **4**: 399-430.
- Moynihan, K. A., A. A. Grimm, et al. (2005). "Increased dosage of mammalian Sir2 in pancreatic beta cells enhances glucose-stimulated insulin secretion in mice." *Cell Metab* **2**(2): 105-17.
- Murphy, M. P. (2009). "How mitochondria produce reactive oxygen species." *Biochem J* **417**(1): 1-13.

- Murphy, M. P., K. S. Echtay, et al. (2003). "Superoxide activates uncoupling proteins by generating carbon-centered radicals and initiating lipid peroxidation: studies using a mitochondria-targeted spin trap derived from alpha-phenyl-N-tert-butyl-nitron." *J Biol Chem* **278**(49): 48534-45.
- Musi, N., M. F. Hirshman, et al. (2002). "Metformin increases AMP-activated protein kinase activity in skeletal muscle of subjects with type 2 diabetes." *Diabetes* **51**(7): 2074-81.
- Nedergaard, J., D. Ricquier, et al. (2005). "Uncoupling proteins: current status and therapeutic prospects." *EMBO Rep* **6**(10): 917-21.
- Negre-Salvayre, A., C. Hirtz, et al. (1997). "A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation." *Faseb J* **11**(10): 809-15.
- Nepokroeff, C. M., M. R. Lakshmanan, et al. (1975). "Fatty-acid synthase from rat liver." *Methods Enzymol* **35**: 37-44.
- Nicholls, D. G. and S. Chalmers (2004). "The integration of mitochondrial calcium transport and storage." *J Bioenerg Biomembr* **36**(4): 277-81.
- Nicholls, D. G. and R. M. Locke (1984). "Thermogenic mechanisms in brown fat." *Physiol Rev* **64**(1): 1-64.
- Nicholls, D. G. and E. Rial (1999). "A history of the first uncoupling protein, UCP1." *J Bioenerg Biomembr* **31**(5): 399-406.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system." *Free Radic Biol Med* **31**(11): 1287-312.
- Ntambi, J. M. and K. Young-Cheul (2000). "Adipocyte differentiation and gene expression." *J Nutr* **130**(12): 3122S-3126S.
- Nubel, T., Y. Emre, et al. (2008). "Modified glutamine catabolism in macrophages of Ucp2 knock-out mice." *Biochim Biophys Acta* **1777**(1): 48-54.
- Ohira, M., Y. Miyashita, et al. (2009). "Metformin promotes induction of lipoprotein lipase in skeletal muscle through activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase." *Metabolism* **58**(10): 1408-14.
- Orci, L., W. S. Cook, et al. (2004). "Rapid transformation of white adipocytes into fat-oxidizing machines." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(7): 2058-63.
- Orrenius, S. (2007). "Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death." *Drug Metab Rev* **39**(2-3): 443-55.
- Ota, K., J. Nakamura, et al. (2007). "Metformin prevents methylglyoxal-induced apoptosis of mouse Schwann cells." *Biochem Biophys Res Commun* **357**(1): 270-5.
- Ott, M., V. Gogvadze, et al. (2007). "Mitochondria, oxidative stress and cell death." *Apoptosis* **12**(5): 913-22.
- Ouslimani, N., J. Peynet, et al. (2005). "Metformin decreases intracellular production of reactive oxygen species in aortic endothelial cells." *Metabolism* **54**(6): 829-34.
- Owen, M. R., E. Doran, et al. (2000). "Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain." *Biochem J* **348 Pt 3**: 607-14.
- Palmieri, F. (2004). "The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications." *Pflugers Arch* **447**(5): 689-709.
- Palmieri, L., B. Pardo, et al. (2001). "Citric and aspartate are Ca(2+)-stimulated aspartate/glutamate transporters in mitochondria." *Embo J* **20**(18): 5060-9.
- Park, H., V. K. Kaushik, et al. (2002). "Coordinate regulation of malonyl-CoA decarboxylase, sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase, and acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase in rat tissues in response to exercise." *J Biol Chem* **277**(36): 32571-7.

- Patane, G., M. Anello, et al. (2002). "Role of ATP production and uncoupling protein-2 in the insulin secretory defect induced by chronic exposure to high glucose or free fatty acids and effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibition." *Diabetes* **51**(9): 2749-56.
- Pavlovic, D., R. Kocic, et al. (2000). "Effect of four-week metformin treatment on plasma and erythrocyte antioxidative defense enzymes in newly diagnosed obese patients with type 2 diabetes." *Diabetes Obes Metab* **2**(4): 251-6.
- Pebay-Peyroula, E., C. Dahout-Gonzalez, et al. (2003). "Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside." *Nature* **426**(6962): 39-44.
- Pecqueur, C., M. C. Alves-Guerra, et al. (2001). "Uncoupling protein 2, in vivo distribution, induction upon oxidative stress, and evidence for translational regulation." *J Biol Chem* **276**(12): 8705-12.
- Pecqueur, C., T. Bui, et al. (2008). "Uncoupling protein-2 controls proliferation by promoting fatty acid oxidation and limiting glycolysis-derived pyruvate utilization." *Faseb J* **22**(1): 9-18.
- Pecqueur, C., A. M. Cassard-Doulcier, et al. (1999). "Functional organization of the human uncoupling protein-2 gene, and juxtaposition to the uncoupling protein-3 gene." *Biochem Biophys Res Commun* **255**(1): 40-6.
- Pedersen, S. B., B. Nyholm, et al. (2005). "Increased adiposity and reduced adipose tissue mRNA expression of uncoupling protein-2 in first-degree relatives of type 2 diabetic patients: evidence for insulin stimulation of UCP-2 and UCP-3 gene expression in adipose tissue." *Diabetes Obes Metab* **7**(1): 98-105.
- Pi, J., Y. Bai, et al. (2009). "Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic beta-cell function." *Endocrinology* **150**(7): 3040-8.
- Produit-Zengaffinen, N., N. Davis-Lameloise, et al. (2007). "Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species." *Diabetologia* **50**(1): 84-93.
- Prunet-Marcassus, B., B. Cousin, et al. (2006). "From heterogeneity to plasticity in adipose tissues: site-specific differences." *Exp Cell Res* **312**(6): 727-36.
- Raha, S. and B. H. Robinson (2000). "Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing." *Trends Biochem Sci* **25**(10): 502-8.
- Ramirez-Zacarias, J. L., F. Castro-Munozledo, et al. (1992). "Quantitation of adipose conversion and triglycerides by staining intracytoplasmic lipids with Oil red O." *Histochemistry* **97**(6): 493-7.
- Rayner, D. V. and P. Trayhurn (2001). "Regulation of leptin production: sympathetic nervous system interactions." *J Mol Med* **79**(1): 8-20.
- Rial, E., E. Aguirregoitia, et al. (2004). "Alkylsulfonates activate the uncoupling protein UCP1: implications for the transport mechanism." *Biochim Biophys Acta* **1608**(2-3): 122-30.
- Rial, E., M. Gonzalez-Barroso, et al. (1999). "Retinoids activate proton transport by the uncoupling proteins UCP1 and UCP2." *Embo J* **18**(21): 5827-33.
- Rial, E. and M. M. Gonzalez-Barroso (2001). "Physiological regulation of the transport activity in the uncoupling proteins UCP1 and UCP2." *Biochim Biophys Acta* **1504**(1): 70-81.
- Rial, E. and D. G. Nicholls (1983). "The regulation of the proton conductance of brown fat mitochondria. Identification of functional and non-functional nucleotide-binding sites." *FEBS Lett* **161**(2): 284-8.

- Rial, E. and R. Zardoya (2009). "Oxidative stress, thermogenesis and evolution of uncoupling proteins." *J Biol* **8**(6): 58.
- Ricquier, D. and F. Bouillaud (2000). "The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP." *Biochem J* **345 Pt 2**: 161-79.
- Ricquier, D. and J. C. Kader (1976). "Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study." *Biochem Biophys Res Commun* **73**(3): 577-83.
- Robinson, A. J., C. Overy, et al. (2008). "The mechanism of transport by mitochondrial carriers based on analysis of symmetry." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(46): 17766-71.
- Rolo, A. P. and C. M. Palmeira (2006). "Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress." *Toxicol Appl Pharmacol* **212**(2): 167-78.
- Ronti, T., G. Lupattelli, et al. (2006). "The endocrine function of adipose tissue: an update." *Clin Endocrinol (Oxf)* **64**(4): 355-65.
- Rossmeisl, M., P. Flachs, et al. (2004). "Role of energy charge and AMP-activated protein kinase in adipocytes in the control of body fat stores." *Int J Obes Relat Metab Disord* **28 Suppl 4**: S38-44.
- Ruzicka, M., E. Skobisova, et al. (2005). "Recruitment of mitochondrial uncoupling protein UCP2 after lipopolysaccharide induction." *Int J Biochem Cell Biol* **37**(4): 809-21.
- Salt, I. P., J. M. Connell, et al. (2000). "5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR) inhibits insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes." *Diabetes* **49**(10): 1649-56.
- Samartsev, V. N., R. A. Simonyan, et al. (2000). "Comparative study on uncoupling effects of laurate and lauryl sulfate on rat liver and skeletal muscle mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1459**(1): 179-90.
- Samec, S., J. Seydoux, et al. (1998). "Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissue: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate?" *Faseb J* **12**(9): 715-24.
- Samec, S., J. Seydoux, et al. (1999). "Post-starvation gene expression of skeletal muscle uncoupling protein 2 and uncoupling protein 3 in response to dietary fat levels and fatty acid composition: a link with insulin resistance." *Diabetes* **48**(2): 436-41.
- Samudio, I., M. Fiegl, et al. (2009). "Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism." *Cancer Res* **69**(6): 2163-6.
- Santomauro Junior, A. C., M. R. Ugolini, et al. (2008). "[Metformin and AMPK: an old drug and a new enzyme in the context of metabolic syndrome]." *Arq Bras Endocrinol Metabol* **52**(1): 120-5.
- Sasahara, M., M. Nishi, et al. (2004). "Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A affects its expression in beta-cells and modulates clinical profiles of Japanese type 2 diabetic patients." *Diabetes* **53**(2): 482-5.
- Savontaus, E., J. Rouru, et al. (1998). "Differential regulation of uncoupling proteins by chronic treatments with beta 3-adrenergic agonist BRL 35135 and metformin in obese fa/fa Zucker rats." *Biochem Biophys Res Commun* **246**(3): 899-904.
- Scherer, P. E., S. Williams, et al. (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." *J Biol Chem* **270**(45): 26746-9.
- Schrauwen, P. and M. Hesselink (2002). "UCP2 and UCP3 in muscle controlling body metabolism." *J Exp Biol* **205**(Pt 15): 2275-85.
- Schrauwen, P. and M. K. Hesselink (2004). "The role of uncoupling protein 3 in fatty acid metabolism: protection against lipotoxicity?" *Proc Nutr Soc* **63**(2): 287-92.

- Seale, P., B. Bjork, et al. (2008). "PRDM16 controls a brown fat/skeletal muscle switch." *Nature* **454**(7207): 961-7.
- Seifert, E. L., V. Bezaire, et al. (2008). "Essential role for uncoupling protein-3 in mitochondrial adaptation to fasting but not in fatty acid oxidation or fatty acid anion export." *J Biol Chem* **283**(37): 25124-31.
- Selvin, E., S. Bolen, et al. (2008). "Cardiovascular outcomes in trials of oral diabetes medications: a systematic review." *Arch Intern Med* **168**(19): 2070-80.
- Shaw, R. J., K. A. Lamia, et al. (2005). "The kinase LKB1 mediates glucose homeostasis in liver and therapeutic effects of metformin." *Science* **310**(5754): 1642-6.
- Shen, H., L. Qi, et al. (2006). "Uncoupling protein 2 promoter polymorphism -866G/A, central adiposity, and metabolic syndrome in Asians." *Obesity (Silver Spring)* **14**(4): 656-61.
- Singh, S., R. M. Greene, et al. (2009). "Arsenate-induced apoptosis in murine embryonic maxillary mesenchymal cells via mitochondrial-mediated oxidative injury." *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*.
- Skrha, J., M. Prazny, et al. (2007). "Oxidative stress and endothelium influenced by metformin in type 2 diabetes mellitus." *Eur J Clin Pharmacol* **63**(12): 1107-14.
- Skurk, T. and H. Hauner (2004). "Obesity and impaired fibrinolysis: role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1." *Int J Obes Relat Metab Disord* **28**(11): 1357-64.
- Spitz, D. R. and L. W. Oberley (1989). "An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates." *Anal Biochem* **179**(1): 8-18.
- Steppan, C. M., S. T. Bailey, et al. (2001). "The hormone resistin links obesity to diabetes." *Nature* **409**(6818): 307-12.
- Steppan, C. M. and M. A. Lazar (2004). "The current biology of resistin." *J Intern Med* **255**(4): 439-47.
- Szabadkai, G. and M. R. Duchen (2008). "Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling." *Physiology (Bethesda)* **23**: 84-94.
- Takahashi, A., K. Motomura, et al. (2005). "Transgenic mice overexpressing nuclear SREBP-1c in pancreatic beta-cells." *Diabetes* **54**(2): 492-9.
- Teshima, Y., M. Akao, et al. (2003). "Uncoupling protein-2 overexpression inhibits mitochondrial death pathway in cardiomyocytes." *Circ Res* **93**(3): 192-200.
- Tessier, D., P. Maheux, et al. (1999). "Effects of gliclazide versus metformin on the clinical profile and lipid peroxidation markers in type 2 diabetes." *Metabolism* **48**(7): 897-903.
- Tietze, F. (1969). "Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues." *Anal Biochem* **27**(3): 502-22.
- Tomas, P., J. Jimenez-Jimenez, et al. (2004). "Activation by retinoids of the uncoupling protein UCP1." *Biochim Biophys Acta* **1658**(1-2): 157-64.
- Tong, W. H., G. N. Jameson, et al. (2003). "Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(17): 9762-7.
- Towler, M. C. and D. G. Hardie (2007). "AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling." *Circ Res* **100**(3): 328-41.
- Trachootham, D., W. Lu, et al. (2008). "Redox regulation of cell survival." *Antioxid Redox Signal* **10**(8): 1343-74.
- Trayhurn, P. (2005). "The biology of obesity." *Proc Nutr Soc* **64**(1): 31-8.
- Trayhurn, P. and I. S. Wood (2004). "Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue." *Br J Nutr* **92**(3): 347-55.

- Trenker, M., R. Malli, et al. (2007). "Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca^{2+} uniport." *Nat Cell Biol* **9**(4): 445-52.
- Trujillo, M. E. and P. E. Scherer (2005). "Adiponectin--journey from an adipocyte secretory protein to biomarker of the metabolic syndrome." *J Intern Med* **257**(2): 167-75.
- Trujillo, M. E. and P. E. Scherer (2006). "Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease." *Endocr Rev* **27**(7): 762-78.
- Turner, N., J. Y. Li, et al. (2008). "Berberine and its more biologically available derivative, dihydroberberine, inhibit mitochondrial respiratory complex I: a mechanism for the action of berberine to activate AMP-activated protein kinase and improve insulin action." *Diabetes* **57**(5): 1414-8.
- Turrens, J. F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." *J Physiol* **552**(Pt 2): 335-44.
- Turrens, J. F., A. Alexandre, et al. (1985). "Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria." *Arch Biochem Biophys* **237**(2): 408-14.
- Ukkola, O. (2002). "Resistin - a mediator of obesity-associated insulin resistance or an innocent bystander?" *Eur J Endocrinol* **147**(5): 571-4.
- Unger, R. H. (2000). "Leptin physiology: a second look." *Regul Pept* **92**(1-3): 87-95.
- Ursini, F., M. Maiorino, et al. (1995). "Diversity of glutathione peroxidases." *Methods Enzymol* **252**: 38-53.
- Valko, M., D. Leibfritz, et al. (2007). "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease." *Int J Biochem Cell Biol* **39**(1): 44-84.
- van Bladeren, P. J. (2000). "Glutathione conjugation as a bioactivation reaction." *Chem Biol Interact* **129**(1-2): 61-76.
- Van Harmelen, V., S. Reynisdottir, et al. (1999). "Mechanisms involved in the regulation of free fatty acid release from isolated human fat cells by acylation-stimulating protein and insulin." *J Biol Chem* **274**(26): 18243-51.
- Vidal-Puig, A., G. Solanes, et al. (1997). "UCP3: an uncoupling protein homologue expressed preferentially and abundantly in skeletal muscle and brown adipose tissue." *Biochem Biophys Res Commun* **235**(1): 79-82.
- Villarroya, F., R. Iglesias, et al. (2007). "PPARs in the Control of Uncoupling Proteins Gene Expression." *PPAR Res* **2007**: 74364.
- Voehringer, D. W., D. L. Hirschberg, et al. (2000). "Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(6): 2680-5.
- Votyakova, T. V. and I. J. Reynolds (2001). "DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria." *J Neurochem* **79**(2): 266-77.
- Walker, J. E. and M. J. Runswick (1993). "The mitochondrial transport protein superfamily." *J Bioenerg Biomembr* **25**(5): 435-46.
- Wang, L. W., Z. S. Li, et al. (2008). "Metformin induces apoptosis of pancreatic cancer cells." *World J Gastroenterol* **14**(47): 7192-8.
- Wang, M. Y., Y. Lee, et al. (1999). "Novel form of lipolysis induced by leptin." *J Biol Chem* **274**(25): 17541-4.
- Wang, M. Y., L. Orci, et al. (2005). "Fat storage in adipocytes requires inactivation of leptin's paracrine activity: implications for treatment of human obesity." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(50): 18011-6.

- Wang, T. N., M. C. Huang, et al. (2007). "UCP2 A55V variant is associated with obesity and related phenotypes in an aboriginal community in Taiwan." *Int J Obes (Lond)* **31**(11): 1746-52.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* **123**(3191): 309-14.
- Watson, R. T. and J. E. Pessin (2006). "Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation." *Trends Biochem Sci* **31**(4): 215-22.
- Weisberg, S. P., D. McCann, et al. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." *J Clin Invest* **112**(12): 1796-808.
- Wieland, O. (1957). "[Enzymic method for the determination of glycerin.]" *Biochem Z* **329**(4): 313-9.
- Wiernsperger, N. F. and C. J. Bailey (1999). "The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms." *Drugs* **58 Suppl 1**: 31-9; discussion 75-82.
- Winder, W. W., H. A. Wilson, et al. (1997). "Phosphorylation of rat muscle acetyl-CoA carboxylase by AMP-activated protein kinase and protein kinase A." *J Appl Physiol* **82**(1): 219-25.
- Winkler, E. and M. Klingenberg (1992). "Photoaffinity labeling of the nucleotide-binding site of the uncoupling protein from hamster brown adipose tissue." *Eur J Biochem* **203**(1-2): 295-304.
- Winkler, E. and M. Klingenberg (1994). "Effect of fatty acids on H⁺ transport activity of the reconstituted uncoupling protein." *J Biol Chem* **269**(4): 2508-15.
- Wojtczak, L. and P. Schonfeld (1993). "Effect of fatty acids on energy coupling processes in mitochondria." *Biochim Biophys Acta* **1183**(1): 41-57.
- Wolfsdorf, J., A. Sadeghi-Nejad, et al. (2002). "Leptin-replacement therapy in lipodystrophy." *N Engl J Med* **346**(25): 2008-9; author reply 2009-10.
- Woods, A., K. Dickerson, et al. (2005). "Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells." *Cell Metab* **2**(1): 21-33.
- Woods, A., S. R. Johnstone, et al. (2003). "LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade." *Curr Biol* **13**(22): 2004-8.
- Wrutniak-Cabello, C., F. Casas, et al. (2001). "Thyroid hormone action in mitochondria." *J Mol Endocrinol* **26**(1): 67-77.
- Yamada, M., T. Hashida, et al. (1998). "Genomic organization and promoter function of the mouse uncoupling protein 2 (UCP2) gene." *FEBS Lett* **432**(1-2): 65-9.
- Yamagishi, S., T. Okamoto, et al. (2002). "Palmitate-induced apoptosis of microvascular endothelial cells and pericytes." *Mol Med* **8**(4): 179-84.
- Yamaguchi, S., H. Katahira, et al. (2005). "Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **289**(4): E643-9.
- Yamashita, T., K. Eto, et al. (2004). "Role of uncoupling protein-2 up-regulation and triglyceride accumulation in impaired glucose-stimulated insulin secretion in a beta-cell lipotoxicity model overexpressing sterol regulatory element-binding protein-1c." *Endocrinology* **145**(8): 3566-77.
- Yamauchi, T., J. Kamon, et al. (2001). "The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity." *Nat Med* **7**(8): 941-6.
- Yin, W., J. Mu, et al. (2003). "Role of AMP-activated protein kinase in cyclic AMP-dependent lipolysis In 3T3-L1 adipocytes." *J Biol Chem* **278**(44): 43074-80.

- Yudkin, J. S., E. Eringa, et al. (2005). ""Vasocrine" signalling from perivascular fat: a mechanism linking insulin resistance to vascular disease." *Lancet* **365**(9473): 1817-20.
- Zhang, C. Y., G. Baffy, et al. (2001). "Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes." *Cell* **105**(6): 745-55.
- Zhang, C. Y., T. Hagen, et al. (1999). "Assessment of uncoupling activity of uncoupling protein 3 using a yeast heterologous expression system." *FEBS Lett* **449**(2-3): 129-34.
- Zhang, C. Y., L. E. Parton, et al. (2006). "Genipin inhibits UCP2-mediated proton leak and acutely reverses obesity- and high glucose-induced beta cell dysfunction in isolated pancreatic islets." *Cell Metab* **3**(6): 417-27.
- Zhang, K., Y. Shang, et al. (2007). "Uncoupling protein 2 protects testicular germ cells from hyperthermia-induced apoptosis." *Biochem Biophys Res Commun* **360**(2): 327-32.
- Zhou, G., R. Myers, et al. (2001). "Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action." *J Clin Invest* **108**(8): 1167-74.
- Zhou, H., J. Zhao, et al. (2009). "Inhibition of uncoupling protein 2 by genipin reduces insulin-stimulated glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes." *Arch Biochem Biophys* **486**(1): 88-93.
- Zhou, Y. T., M. Shimabukuro, et al. (1997). "Induction by leptin of uncoupling protein-2 and enzymes of fatty acid oxidation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(12): 6386-90.
- Zou, M. H., S. S. Kirkpatrick, et al. (2004). "Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species." *J Biol Chem* **279**(42): 43940-51.